Abteilung Rechtsmedizin
der Universität Ulm
Leiter: Prof. Dr. med. E. Miltner

Untersuchung forensisch relevanter Single Nucleotide Polymorphisms mittels Minisequencing und Kapillarelektrophorese

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von

Sonja Kopp
geboren in Offenbach /Main

2004

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Peter Wiegand

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Möller

Tag der Promotion: 08.07.2005

Gewidmet:

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen 1
2. Einleitung 2
2.1. DNA-Polymorphismen 2
2.1.1. Mitochondriale Sequenzpolymorphismen 3
2.1.2. Y-chromosomale Sequenzpolymorphismen 4
2.2. Analysemethoden für SNPs 5
2.2.1. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen 6
2.2.2. MALDI-TOF MS 6
2.2.3. Hybridisierung 6
2.2.4. Minisequencing 7
2.2.5. Pyrosequencing 8
2.3. Aufgabenstellung 10
3. Material und Methoden 11
3.1. Material 11
3.1.1. DNA-Proben 11
3.1.2. Primer und Oligonukleotide 11
3.1.3. Enzyme 13
3.1.4. Computerprogramme 13
3.2. DNA-Techniken 14
3.2.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 14
3.2.2. SNaPshot-Kit ddNTP Primer Extention Kit 15
3.2.3. Horizontale Polyacrylamid-Gelelektrophorese 18
3.2.4. Kapillarelektrophorese 19
3.2.5. Sequenzierung 20
3.2.6. Restriktionsverdauung 20
4. Ergebnisse 21
4.1. Analyse mitochondrialer SNPs 21
4.1.1. Singleplex mitochondrialer SNPs 21
4.1.2. Multiplex mitochondrialer SNPs 27
4.2. Untersuchung stark degradierter DNA 32
4.3. Analyse Y-chromosomaler SNPs 33
4.3.1. Y-chromosomaler Singleplex 33

4.3.2. Y-chromosomaler Multiplex 38
4.4. Männlich-weibliche Mischspuren 42
4.5. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs) 43
5. Diskussion 46
5.1. Das Prinzip des Minisequencing zum Nachweis von SNPs 46
5.2. Mitochondriale DNA 47
5.3. Untersuchung von Problemspuren 51
5.4. Y-chromosomale SNPs 53
5.5. Männlich-weibliche Mischspuren 56
5.6. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs) 57
5.7. Allgemeines zum SNaPshot-Kit 57
5.7.1. Verunreinigungen 57
5.7.2. Qualitätskriterien 58
5.8. Die Zukunft der SNP-Analytik 60
6. Zusammenfassung 65
7. Literatur 66
8. Danksagungen 73
9. Erklärung 74

1. Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest.	Bidestilliertes Wasser
ASO	Allel-spezifischer Oligonukleotid
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Complementary DNA
CHES	2-Cyclohexylaminoethansulfonsäure
CIP	Calf intestinal phosphatase
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleiacid, Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HVR	Hypervariable Region
kb	Kilobasenpaare
LS	Längenstandard
M	Molar
mA	Miliampere
mtDNA	Mitochondriale DNA
µl	Mikroliter
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDA	Piperazindiacrylamid
pmol	Pikomol
RFLPs	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen
rfu	Relative fluorescence units
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SNP	Single Nucleotide Polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus
STR	Short Tandem Repeat
U	Unit, Enzymeinheit
VNTR	variable number of tandem repeats
w/v	weight per volume, Gewicht pro Volumen

2. Einleitung

2.1. DNA-Polymorphismen

DNA-Polymorphismen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen, in Sequenz- und in Längenpolymorphismen. Im Mittelpunkt der forensischen Analytik stehen bisher die Längenpolymorphismen der hochpolymorphen VNTR-Loci (= variable number of tandem repeats). Ihre genetische Variabilität beruht darauf, dass innerhalb der DNA Abschnitte existieren, die eine unterschiedliche Anzahl kurzer repetitiver, d.h. sich wiederholender DNA-Sequenzblöcke enthalten. Solche repetitiven Sequenzbereiche mit tandemartiger Organisation werden auch als Satelliten-DNA bezeichnet. Man unterscheidet je nach Länge der sich wiederholenden Einheiten zwischen Minisatelliten (10-400 bp) und Mikrosatelliten (1-6 bp) (Tautz et al. 1994). Seit einigen Jahren finden jedoch auch Sequenzpolymorphismen, die sogenannten SNPs (single nucleotide polymorphisms), welche durch Mutation einzelner Basen zustande kommen, mehr Bedeutung. Etwa 90% der Variationen der menschlichen DNA werden durch Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs, Einzelnukleotid Polymorphismen, Punktmutationen) verursacht. Eine ungefähre Zahl über die Gesamtmenge der im menschlichen Genom vorkommenden SNPs zu geben ist bisher nur schwer möglich. Schätzungen gehen jedoch von einer Gesamtmenge von bis zu 11 Mio. SNPs in einem Genom mit 3.2 Milliarden Basenpaaren aus (Kruglyak et al. 2001). Definiert sind SNPs als eine Position auf der DNA, bei der zwei oder mehr alternative Basen mit einer geschätzten Häufigkeit von >1% in der menschlichen Population vorkommen.

Das Spektrum der Anwendbarkeit von SNP-Analysen ist breit. SNPs, die in kodierenden Regionen des menschlichen Genoms liegen und somit Krankheiten verursachen oder begünstigen können, liefern oft wertvolle Hinweise zur exakten Diagnose einer Erkrankung. Hierdurch könnten sich in manchen Fällen bereits frühzeitig Risikogruppen bestimmen lassen (Marsh et al. 2003). Doch auch SNPs in nicht-kodierenden Bereichen der DNA haben sich in zunehmendem Maße als wertvolle Marker erwiesen. In der Phylogenetik werden SNPs herangezogen, um Fragen der menschliche Evolution und der Migration der Menschheit innerhalb der vergangenen Jahrtausende zu lösen (Zerjal et al. 1997).

Die Forensik nutzt SNPs teilweise zur Identifikation z.B. von Leichen oder Leichenteilen, zur Zuordnung von biologischen Spuren zu Spurenverursachern (z.B. zu verdächtigen Personen oder zu in DNA-Datenbanken gespeicherten Täterprofilen), sowie zur Erstellung von Abstammungsgutachten (Vaterschaftstests). Allerdings beschränken sich solche Analysen derzeit noch überwiegend auf mitochondriale, sowie einige Y-chromosomale SNPs. Dies ist unter anderem darin begründet, dass derzeit noch keine hinreichend ausgearbeiteten Datenbanken, sowie Informationen über die Frequenzen der jeweiligen Allele eines SNPs innerhalb einer Population zu Verfügung stehen. In der Zukunft soll jedoch in der Forensik die Anzahl Y-chromosomaler SNPs, sowie die routinemäßige Analyse autosomaler SNPs angestrebt werden.

2.1.1. Mitochondriale Sequenzpolymorphismen

Mitochondriale DNA (mtDNA), das Erbgut der in jeder menschlichen Zelle vorkommenden Mitochondrien, zeigt ähnlich der DNA des Kerns Sequenzpolymorphismen. Verglichen mit Kern-DNA ist die Anzahl der Mutationen der mtDNA pro 1000 bp allerdings 5-10 mal höher, was durch eine größere Häufigkeit von Fehlern während der Replikation und der niedrigeren Reparaturquote bedingt ist (Wilson et al. 1993). So finden sich beispielsweise im Bereich von HVR I 52 Sequenzpolymorphismen, im Bereich von HVR II 29 (Baasner et al. 1998).

Seit der Veröffentlichung der kompletten Sequenz der mtDNA (Anderson et al. 1981) sind bereits zahlreiche Daten über die hypervariablen Regionen I und II (HVR I und II) der Kontrollregion der mitochondrialen DNA erfasst worden (Tully et al. 1996, Parson et al. 1997, Baasner et al. 1998). Dies ist besonders für die Forensik der relevanteste Abschnitt der mtDNA, da er ein nicht-kodierender Bereich mit einer sehr hohen Mutationsrate ist, was im Verlauf der Evolution zu einer Vielzahl an Sequenzpolymorphismen unter nicht verwandten Personen geführt hat. In der Forensik gewinnt die Analyse mitochondrialer SNPs besonders dann an Bedeutung, wenn mit dem derzeit gängigsten Verfahren, der Analyse von Short Tandem Repeats (STRs, historisch auch Mikrosatelliten genannt), keine auswertbaren Befunde erzielt werden können. In solchen Fällen liegt zu wenig Ausgangsmaterial vor oder die Kern-DNA ist zu stark degradiert, wie dies z.B. in Knochenmaterial bei Skelettfunden oder bei wurzellosen Haarfragmenten der Fall ist (Gill

et al. 1994, Boles et al. 1995). STRs kommen im nicht-kodierenden Bereich des menschlichen Genoms vor und bestehen aus einer unterschiedlichen Anzahl sich wiederholender Grundeinheiten. Sie werden mittels PCR amplifiziert und anschließend auf ihre interindividuelle Länge (100-400 bp) und Struktur untersucht (Weber JL 1990, Hearne et al. 1992).

MtDNA eignet sich dabei sehr gut für weitere Untersuchungen, da sie im Vergleich zur DNA des Kerns nicht nur resistenter gegenüber degenerativen Vorgängen ist, sondern sie überdies in jeder Zelle bis zu 1000fach vorkommt. Ist also das für Untersuchungen zur Verfügung stehende Zellmaterial sehr gering, so ist die Wahrscheinlichkeit, eine gerade noch ausreichende Menge mitochondrialer DNA durch PCR amplifizieren zu können, um ein Vielfaches höher, als im Falle von Kern-DNA (Pfeiffer et al. 1998, Gill et al. 1994).

Als erschwerender Faktor für die mtDNA Analytik in der Rechtsmedizin muss jedoch das Vorhandensein von Heteroplasmien angesehen werden. Dies bedeutet, dass innerhalb eines Individuums in seltenen Fällen verschiedene Varianten der mtDNA vorkommen können. Die Verteilung von unterschiedlichen Mutationsformen kann hierbei nicht nur von Zelle zu Zelle differieren, sondern auch zwischen unterschiedlichen Geweben eines Individuums. Als Grund dafür gilt die ungleichmäßige Verteilung der Mitochondrien von der Ausgangszelle auf die Tochterzellen während der Embryogenese bzw. bei späteren Teilungen (Macmillan et al. 1993). Bei der Zuordnung von Spuren zu Spurenverursachern muss dieser besondere Umstand berücksichtigt werden, da die mtDNA der vorhandenen Spur potentiell eine abweichende Sequenz haben kann, als die übrigen Zellen einer Person.

Dass diese Besonderheit der Mitochondrien jedoch nicht nur nachteilig sein muss, zeigte sich im Falle des russischen Zar Nicolas II. Hierbei lieferte die Beobachtung einer in sterblichen Überresten entdeckte Heteroplasmie wertvolle Hinweise bezüglich der Abstammung, die letztendlich mit hoher Wahrscheinlichkeit zu seiner Identifizierung führten (Gill et al. 1994).

2.1.2. Y-chromosomale Sequenzpolymorphismen

In der Forensik gewinnt neben der Analyse von Sequenzpolymorphismen der mitochondrialen DNA auch die des männlichen Y-Chromosoms zunehmend an Bedeutung,

wobei sich die Untersuchungen bisher v.a. auf den Bereich der Phylogenetik erstrecken (Mitchell et al. 1996, Jobling et al. 1995, Hurles et al. 1999). Dies erklärt sich dadurch, dass das Y-Chromosom zum größten Teil nicht-rekombinant ist, so dass Sequenzpolymorphismen auf einzelne Mutationsereignisse zurückgeführt und ihre Vererbung in der männlichen Linie zurückverfolgt werden können. Es wurde bereits eine Vielzahl unterschiedlicher polymorpher Marker auf dem Y-Chromosom untersucht, wobei auch hier den Mikrosatelliten eine zentrale Rolle zukommt (Kayser et al. 1997). Da diese jedoch eine relativ hohe Mutationsrate aufweisen, wurde das Spektrum der Sequenzanalysen in den vergangenen Jahren vermehrt in Richtung SNPs ausgedehnt, welche so langsam mutieren (ca. 2×10^{-8} Mutationen pro Base pro Generation; Thomson et al. 2000), dass sie meist als einmalige Ereignisse der menschlichen Evolution angesehen werden können. Durch die Untersuchung der beiden genannten Systemen ist es somit möglich, unterschiedliche Zeitspannen der Evolution zu erfassen und die väterliche Abstammungslinie ebenso zurück zu verfolgen, wie dies mit der rein durch die Mutter vererbten mitochondrialen DNA für die mütterliche Linie möglich ist.

Im Bereich der forensischen Spurenanalytik spielen Sequenzvariationen des Y-Chromosoms besonders bei der Untersuchung gemischter männlich-weiblicher Spuren eine Rolle. Y-chromosomale STRs sind hierbei nach wie vor Marker der Wahl, jedoch nimmt auch in diesem Bereich der Sequenzanalytik die Bedeutung von SNPs zu, was mit ihren bereits genannten Eigenschaften zusammenhängt. Durch gezielten Nachweis spezifischer Y-chromosomaler Marker ist es möglich, ein männliches Muster aus einer männlich-weiblichen Mischspur zu filtern, auch wenn die männliche DNA nur in winzigen Mengen vorkommt (z.B. Vaginalabstrich nach einer Vergewaltigung). Außerdem kann insbesondere durch Y-chromosomale DNA-Typisierung auf die ethnische Zugehörigkeit einer männlichen Person geschlossen werden, da es unter allen übrigen Chromosomen des menschlichen Genoms einschließlich des mitochondrialen Genoms die größten geographischen Unterschiede in den Allelfrequenzen zeigt (Joblin 2001).

2.2. Analysemethoden für SNPs

Bis vor einigen Jahren war zur Identifizierung von SNPs die Analyse von Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs) die Methode der Wahl (Kan et al.

1978). Inzwischen sind jedoch eine Vielzahl weiterer Methoden etabliert worden. Einige dieser Verfahren zur Untersuchung von SNPs sollen im folgenden kurz dargestellt werden.

2.2.1. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen

RFLPs sind definiert als Unterschiede im Abstand zwischen zwei Restriktionsstellen. Hierbei werden Enzyme mit meist bakteriellem Ursprung eingesetzt, die doppelsträngige DNA an palindromischen Erkennungssequenzen spezifisch schneiden. Ist eine Base innerhalb dieser Erkennungssequenz durch eine Punktmutation verändert, kann das Enzym die DNA nicht mehr zerteilen. Die unterschiedlichen RFLPs können anschließend nach elektrophoretischer Auftrennung im Gel und nachfolgender Färbung sichtbar gemacht werden, so dass sich für einzelne Personen individuelle Bandenmuster ergeben (Liu et al. 1997, Zerjal et al. 1997).

2.2.2. MALDI-TOF MS

DNA-Stücke können an Hand ihres Molekulargewichts genau identifiziert werden, da die verschiedenen Nukleotide Adenin, Guanin, Thymin, Cytosin jeweils spezifische Molekulargewichte aufweisen. Von den verfügbaren Methoden ist das MALDI-TOF MS (Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) die modernste und sensitivste Technik (Braun et al. 1997, Ross et al. 1998, Li et al. 1999). Hierbei werden in einer komplizierten Verkettung aus Hybridisierung einer SNP-spezifischen Sonde an die DNA und enzymatischer Spaltung, SNPs detektiert. Die abgespaltenen Signalmoleküle werden dann im elektrischen Feld beschleunigt, wobei die Zeit bis zum Aufschlagen auf den Detektor das Molekulargewicht des Signalmoleküls widerspiegelt. Somit ist es möglich mit Hilfe der Massenunterschiede von Polymorphismen Genotypisierungen durchzuführen.

2.2.3. Hybridisierung

Ein allel-spezifisches Oligonukleotid (ASO) bindet bei niedriger Temperatur an ein einzelsträngiges PCR-Template. Das somit entstandene DNA-Dimer kann nun mit einem

Farbstoff in Verbindung treten, der die Eigenschaft hat, innerhalb einer solchen Verbindung Fluoreszenzen zu emittieren. Das hierbei entstehende Signal ist proportional zur Menge an vorhandener DNA. Erhöht man anschließend langsam die Temperatur und nimmt die Schmelzkurve des DNA-Hybriden auf, lassen sich Punktmutationen detektieren (Lareu et al. 2000). Da das ASO im Bereich des SNPs an die DNA gebunden hat, schmilzt diese Verbindung bei Vorhandensein einer Mutation bei einer niedrigeren Temperatur, als wenn die nicht-mutierte Variante vorliegt. Dies ist dadurch zu erklären, dass im Falle einer Mutation eine Basenpaarung weniger vorhanden ist, die den Komplex aus DNA-Template und ASO stabilisiert.

2.2.4. Minisequencing

Bei der Minisequencing-Reaktion (Pastinen et al. 1997) bindet ein Primer genau eine Base vor der Lokalisation des SNPs an die einzelsträngige DNA. Komplementär zum Nukleotid des SNPs wird der Primer anschließend, vermittelt durch eine DNA-Polymerase, um ein fluoreszenzmarkiertes ddNTP am 3'-Ende verlängert. Seit Anfang 2000 ist ein Kit erhältlich („SNaPshot-Kit“, Applied Biosystems, Weiterstadt), das auf dem Prinzip des Minisequencing beruht. Der Ablauf der Reaktion ist in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt. Die Analyse sowie Visualisierung der Reaktion erfolgt anschließend mittels Kapillarelektrophorese nach laserinduzierter Fluoreszenzdetektion.

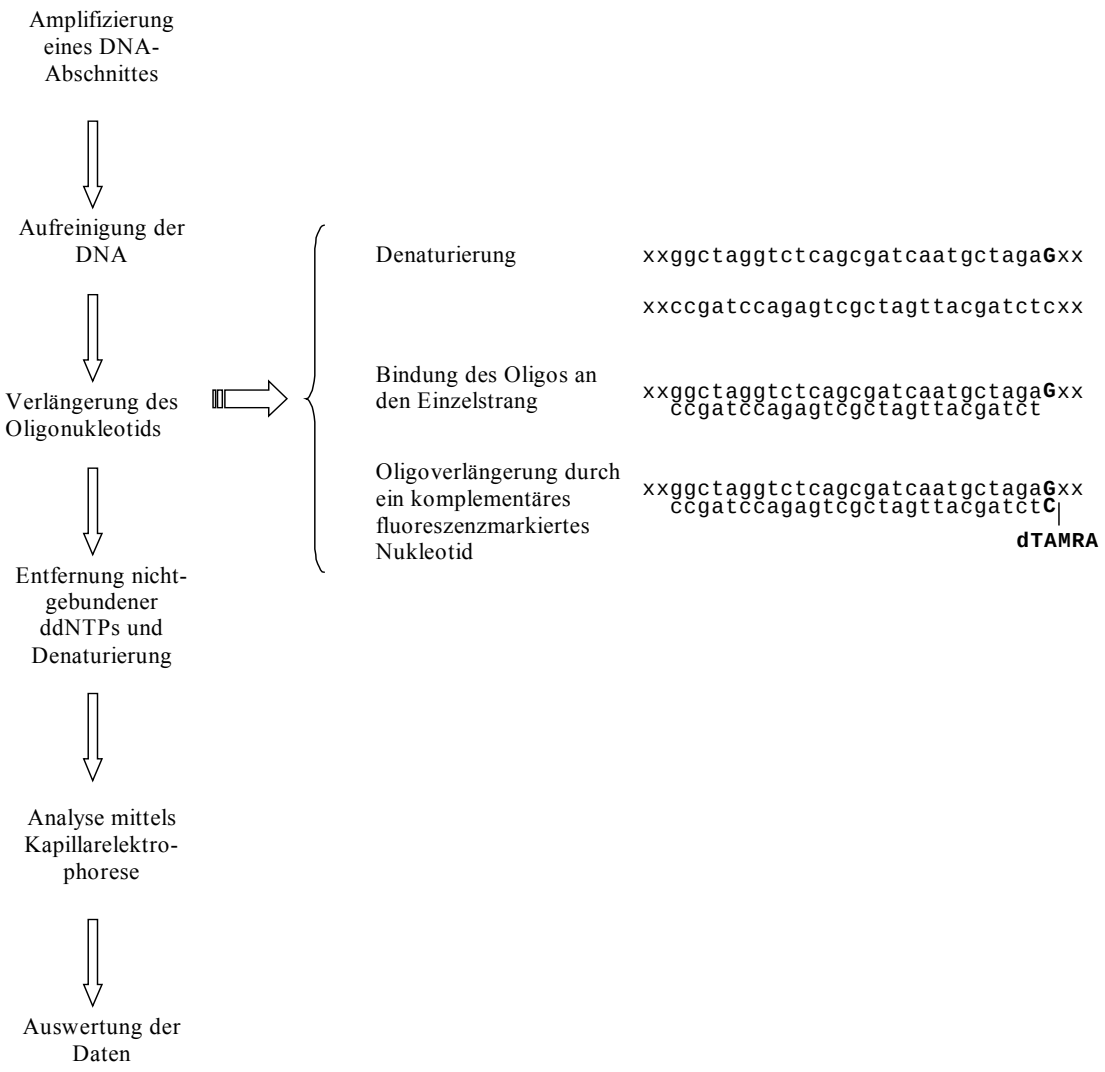


Abbildung 2.1: Schematischer Ablauf der Reaktion bei der Untersuchung von SNPs mit Hilfe des SNaPshot-Kits.

2.2.5. Pyrosequencing

Die Methode des Pyrosequencing (Nordstrom et al. 2000) beruht auf der schrittweisen Verlängerung eines Primers durch eine DNA-Polymerase. Es handelt sich hierbei um eine Art des Minisequencing, bei der Primer jedoch um mehr als ein Nukleotid verlängert wird (bis zu 50 Nukleotide). Es wird jeweils nur eines der vier Desoxynucleotidtriphosphate (dNTP) nacheinander der Reaktion zugeführt und, falls es komplementär zur DNA-Matritze ist, eingebaut. Der hierbei freiwerdende Phosphatrest wird anschließend durch

enzymatische Vermittlung in ein Lichtsignal umgesetzt, dessen Intensität proportional zur Menge der eingebauten Nukleotide ist.

2.3. Aufgabenstellung

Gegenstand des ersten Teils dieser Arbeit war es, das SNaPshot-Kit als Nachweismethode für Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) im Bereich der forensischen DNA-Analytik zu erproben. Hierzu sollten Untersuchungen an forensisch relevanten SNPs der Regionen HVR I und II des menschlichen, mitochondrialen Genoms durchgeführt werden.

Ferner sollte überprüft werden, ob sich das Kit für die Analyse mehrerer mitochondrialer SNPs in einem Ansatz (Multiplex) eignet.

Im weiteren Verlauf sollte die Anwendbarkeit des SNaPshot-Kits für forensische Fragestellungen im Vordergrund stehen. Hierbei sollten Spurenfälle untersucht werden, bei denen die DNA aufgrund des Alters oder schlechter Lagerungsbedingungen degradiert war.

Im zweiten Teil der Arbeit lag der Fokus bei SNPs des menschlichen Y-Chromosoms. Analog den Versuchen mit mitochondrialen DNA sollten Y-SNPs mit Hilfe des SNaPshot-Kit einzeln, sowie als Multiplex untersucht werden.

Schließlich sollte der Anwendbarkeit des Kits hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität in männlich-weiblichen Mischspuren geprüft werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. DNA-Proben

Die analysierten DNA-Proben sind menschlicher Herkunft. Verwendet wurden in der Mehrzahl der Fälle Blut- sowie Speichelproben aus Vaterschaften und Spurenfällen. Des weiteren wurden in einem Fall Abstriche von Kleidungen untersucht, sowie eine Knochenprobe und ein Zigarettenstummel.

Im Falle der Knochenprobe erfolgte die DNA-Extraktion mit dem Extraktionskit von GEN-IAL (GEN-IAL GmbH, Troisdorf) nach Protokoll des Herstellers. Bei allen anderen Proben wurde die DNA nach einem modifizierten Chelex Protokoll (Wiegand et al. 1993) extrahiert.

Mischspuren mit variablen Verhältnissen von männlicher und weiblicher DNA (1:1, 1:10, 1:30, 1:40, 1:50, 1:100, 1: 200) wurden hergestellt.

3.1.2. Primer und Oligonukleotide

Die verwendeten Primer und Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech AG, sowie Interactiva (Ulm) bezogen. Eine Bildung von Dimeren der Oligonukleotide wurde über die Durchführung einer Negativkontrolle ausgeschlossen (Leerprobe).

Tabelle 3.1 Primer für mtDNA

Bezeich-nung des SNPs	Forward Primer (5'➡ 3')	Reverse Primer (5'➡ 3')	Fragment-länge (bp)	Referenzquelle
HVR I	TCATGGGAAGCAGATTTGG	GGATTTGACTGTAATGTGCTATG	326	Morley et al, 1999
HVR II	TGCATTTGGTATTTTCGTCTG	CAGAGATGTGTTTAAGTGCTGT	302	Morley et al, 1999

Tabelle 3.2 Primer für das Y-Chromosom

Bezeichnung des SNPs	Forward Primer (5'➡ 3')	Reverse Primer (5'➡ 3')	Fragmentlänge (bp)	Referenzquelle	GBD Nummer
SRY-2627	GAACTCCTTTACTGGGGTGATG	ATACGTGATGGTGACTGAACAG	376	Lareu et al., 2000	L08063
SRY-1532	TCCTTAGCAACCATTAATCTGG	ATAGCAAAAAATGACACAAGGCA	165	Lareu et al., 2000	L08063
Tat 1 und 2	TTCCAAAGATTAGAGATGATT	GGAGGCCGAGGTGGGTGGAT	112	Zerjal et al., 1997	AC002531
M9	GCAGCATATAAAACTTTCAGG	AAAACCTAACTTTGCTCAAGC	340	Lareu et al., 2000	AC003032
M89	AGAAGCAGATTGATGTCCCACT	TCCAGTTAGGAGATCCCCTCA	527	Pers. Commun.: Peter deKnijff	AC010889
TSC- 0317027	TTCCAAAGATTAGAGATGATT	GGAGGCCGAGGTGGGTGGAT	431	www.snp.cshl.org	AL590142
sY81	AGGCACTGGTCAGAATGAAG	AATGGAAAATACAGCTCCCC	209	Lareu et al., 2000	S76940
M45	GCTGGCAAGACACTTCTGAG	AATATGTTCCTGACACCTTCC	352	Pers. Commun.: Peter deKnijff	XM_010478

Tabelle 3.3 Oligonukleotide für mt-SNPs

Bezeichnung des SNPs	Oligonukleotid	Mutation
H16070	TTTTTTTTTTTTTTTTAAATACATAGCGGTTGTTGATGGGT	C → T
H16224	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGTTGCAGTTGATGTGTGATAGTT	C → T
H00074	TTTTTTTTTCCAGCGTCTCGCAATGCTATCGCGTGCA	A → G
H00153	TTTTTTTTTTTTTTTTCTGTAATATTGAACGTAGGTGCGATAAATAAT	T → C
H00248	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGTGGAAAGTGGCTGTGCAGACATT	G → A
H00303	GTCGTGTGGCCAGAAGCGGGGGGAGGGGGGG	Insertion C

Tabelle 3.4 Oligonukleotide für Y-SNPs

Bezeichnung des SNPs	Oligonukleotid	Mutation
SRY-2627	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCATGGGGCTTCACCCTGTGG	C → T
SRY-1532	TCTGGCCTCTTGTATCTGACTTTTTCACACAGT	G → T
RBF-5	CCTTCTCTCTTGCTGTGCTCTGAAATATTAAATTAAAACAAC	T → C
M9	ACTGCAAAGAAACGGCCTAAGATGGTTGAAT	C → G
M89	CTTTGGGTCCAGGATCACAGCAAAGGTAGCTGCAACTCAGGCAAAGTGAGAGAT	C → T
TSC-0317027	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATTCTTCAGTGAGATGTATC	C → G
sY81	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTTTATCCTCCACAGATCTCA	G → T
M45	GTTTGTTTGTTTCTTAAATCCTACTATCTCCTGGCCTGGACCTCAGAAGGAGCTTTTTGC	G → A

3.1.3. Enzyme

- Calf intestinal phosphatase (CIP) (New England BioLabs)
- AmpliTaq-Polymerase (Roche)
- Restriktionsenzym Hsp II (Promega)

3.1.4. Computerprogramme

Zur Überprüfung der Primer und Oligonukleotide auf Bildung von Dimeren und Hairpins wurde das Programm PrimerSelect (DNAStar, Madison, USA, www.dnastar.com) angewandt.

Für die Analyse der Rohdaten des ABI Prism 310 Genetic Analyzers (Applied Biosystems) wurden die zugehörigen Auswertungsprogramme des Herstellers verwendet, wie sie im Protokoll des SNaPshot ddNTP Primer Extension Kit empfohlen werden. Abweichend vom Protokoll wurde anstatt der empfohlenen Matrix E die Matrix D verwendet.

3.2. DNA-Techniken

3.2.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur *in vitro*- Vervielfachung von DNA- Fragmenten wird häufig das Verfahren der *polymerase chain reaction* (PCR) nach Mullis (1986) unter Verwendung einer thermostabilen Taq-DNA-Polymerase angewandt. Es erlaubt, das von einem Vorwärts (sense)- und einem Rückwärts (antisense)- Oligonukleotid flankierte DNA-Fragment selektiv zu amplifizieren. Die PCR-Reaktion wurde in einem Volumen von 12,85µl (bzw. einem Vielfachen hiervon, Teilvolumina blieben dabei gleich) durchgeführt. Darin enthalten waren:

9µl Aqua bidest.

1µl DNA-Template

0,75µl Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)

0,15µl Rinderserumalbumin (BSA)

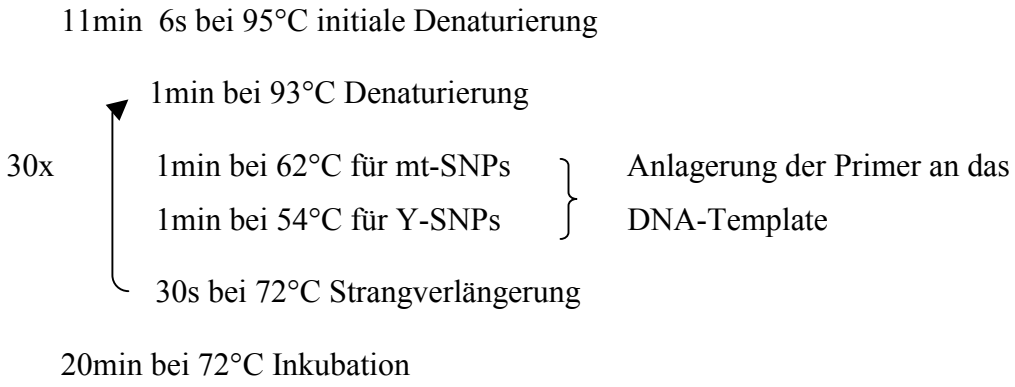
1,0µl 10xPCR-Puffer (Roche)

0,5µl Desoxynukleotide (dNTPs)

0,15µl AmpliTaq-Polymerase (5U/µl) (Roche)

je 0,15µl (50pmol/µl) Vorwärts- und Rückwärts-Primer

Ein typisches Temperaturprogramm setzte sich folgendermaßen zusammen:



Die PCR-Reaktionen wurden in einem Biometra Thermocycler T1 durchgeführt.

Anschließend an die PCR wurden die Proben mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden) aufgereinigt.

3.2.2. SNaPshot-Kit ddNTP Primer Extention Kit

Der Kit besteht aus folgenden Komponenten:

- *SNaPshot Ready Reaction Premix* (bestehend aus Reaktionspuffer, fluoreszenzmarkierte ddNTPs, sowie AmpliTaq DNA-Polymerase in unbekannten Mengenverhältnissen)
- *SNaPshot Control Primers*
- *pGEM-3Zf(+)* (doppelsträngige Kontroll-DNA)

Aufgereinigtes PCR-Amplifikat und Oligonukleotide müssen je nach Fragestellung hinzugefügt werden.

Jeder im SNaPshot-Premix enthaltene ddNTP ist mit einem der folgenden Fluoreszenzfarbstoff markiert:

Tabelle 3.5: Zuordnung der Fluoreszenzmarkierungen zu den einzelnen ddNTPs

ddNTP	Fluoreszenzfarbstoff	Signalfarbe
A	dR6G	Grün
C	dTAMRA	Schwarz
G	dR110	Blau
T	dROX	Rot

Die Reaktionen mit dem SNaPshot-Kit wurden entsprechend den Vorgaben des Herstellers durchgeführt, wobei Teilvolumina und Reaktionsbedingungen teilweise modifiziert wurden.

Der Ansatz mit dem SNaPshot-Kit wurde für mtDNA üblicherweise in einem Volumen von 10µl durchgeführt. Darin enthalten waren:

5,0µl SNaPshot Ready Reaction Premix

Oligonukleotid (100pmol/µl):

H00074 → 30 pmol/µl

H00153 → 30 pmol/µl

H00248 → 60 pmol/µl

H00303 → 30 pmol/µl

H16070 → 60 pmol/µl

H16224 → 80 pmol/µl

1,0µl DNA-Template (PCR-Produkt 1:10 verdünnt)

3,7-2,8µl Aqua bidest.

Das verwendete Temperaturprogramm folgte für Analysen von mitochondrialen SNPs dem Protokoll des Herstellers:

25 Zyklen mit je 10s Denaturierung bei 96°C

5s Anlagerung des Oligonukleotide an das DNA-Template bei 50°C

30s Verlängerung des Primers bei 60°C

Bis zur Weiterverarbeitung der Proben wurden sie bei 4°C aufbewahrt.

Analysen Y-chromosomaler SNPs wurden in einem Volumen von 9µl durchgeführt, zusammengesetzt aus:

4,5µl SNaPshot Ready Reaction Premix

5pmol/µl Oligonukleotid

4µl DNA-Template (unverdünnt)

Das Temperaturprotokoll wurde hierbei modifiziert, so dass es sich wie folgt zusammensetzte:

30 Zyklen mit je 10s Denaturierung bei 96°C

15s Anlagerung des Oligonukleotidean das DNA-Template bei 50°C

60s Verlängerung des Primers bei 60°C.

Bis zur Weiterverarbeitung der Proben wurden sie bei 4°C aufbewahrt.

Im weiteren Verlauf der Reaktionen stimmten die Protokolle von sowohl mitochondrialer als auch Y-chromosomaler DNA überein.

Nach Zugabe von 1U CIP wurde das PCR-Produkt 1h lang bei 37°C inkubiert, so dass nicht eingebaute ddNTPs zerstört werden konnten. Anschließend wurde das Enzym 15 min bei 72°C inaktiviert. Bis zur Weiterverarbeitung erfolgte die Aufbewahrung bei 4°C.

Zur Vorbereitung der Probe für den ABI Prism 310 Genetic Analyzer wurden zu 1µl Reaktionsansatz 10µl deionisiertes Formamid, sowie 0,4µl Längenstandard (genRes® LS500dROX, Serac) hinzugegeben. Die Probe wurde auf 72°C erhitzt und bis zur Analyse durch die Kapillarelektrophorese bei 4°C aufbewahrt. Zur Darstellung und Analyse der Ergebnisse des SNaPshot ddNTP Primer Extention Kits wurde in dieser Arbeit der ABI Prism® 310 Genetic Analyzer verwendet.

Anfang 2001 wurde das SNaPshot ddNTP Primer Extension Kit durch das sogenannte SNaPshot Multiplex Kit abgelöst. Dieses sollte im Gegensatz zum ersten Kit die Möglichkeit eines Multiplexes geben.

3.2.3. Horizontale Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese lassen sich DNA-Moleküle im elektrischen Feld aufgrund ihrer Größe auftrennen und analysieren. Alle DNA-Moleküle wandern, bedingt durch ihre negativ geladenen Phosphatgruppen, zur Kathode, wobei kleinere Moleküle schneller wandern als große.

Es wurden Gele der Größe 230 x 110 x 3 mm gegossen, wobei Piperazindiacrylamid (PDA) als Vernetzer verwendet wurde, um den Hintergrund bei der anschließenden Silberfärbung zu reduzieren. Für die Herstellung der Polyacrylamidgele wurden folgende Lösungen verwendet:

Lösung 1:	30% (w/v)	Polyacrylamidcrylamid (PAA)
	0,9% (w/v)	Piperazindiacrylamid (PDA)
Lösung 2:	0,28 M	2-Cyclohexylaminoethansulfonsäure (CHES), ph 9,0
Lösung 3:	0,5 M	Tris/Formiat, pH 9,0
Lösung 4:	0,35 M	Tris/Sulfat, pH 9,0

Die Polymerisation erfolgte mit Hilfe von:

10 % (w/v)	Ammoniumperoxodisulfat (APS)
	N, N, N', N'-Tetramethylendiamin (TEMED)

Die Lagerung der Gele erfolgte bei 4°C im Kühlschrank. Des Weiteren wurden Agaroseblöcke gegossen (ca. 20 cm x 1 cm x 0,5 cm), die als Kontaktstelle zwischen Gel und Elektroden bei der Elektrophorese dienten. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Agaroseplugs in 0,28 M Tris-Borat unter Zugabe von etwas Bromphenolblau bei 4°C gelagert.

Die horizontale Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde in dieser Arbeit verwendet, um

die Qualität der amplifizierten PCR-Produkte nachzuweisen, den DNA-Gehalt einer Probe abzuschätzen, sowie zum Nachweis von Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen.

Zur Visualisierung der doppelsträngigen DNA im Gel wurde eine modifizierte Methode der Silberfärbung nach Budowle et al. (1991) angewandt. Um Artefaktbildungen zu vermeiden, wurde zum Spülen der Gele ausschließlich doppelt destilliertes Wasser verwendet (Aqua bidest.). Für die Färbung wurden folgende Lösungen verwendet:

- Zur Fixierung: 2% (v/v) Salpetersäure für 3min
- Färbung: 0,2% (w/v)Silbernitrat für 20min
- Entwickler: 0,28M Natriumcarbonat für ca. 2min
  0,05% Formaldehyd
- 7,5% Essigsäure für ca. 3min
- 5% Glyzerol für 20min

3.2.4. Kapillarelektrophorese

Bei der Kapillarelektrophorese handelt es sich um ein hocheffizientes Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von DNA, Aminosäuren und kleinen Peptiden. Die Trennung basiert auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit von ionischen Materialien im elektrischen Feld, wobei die Auftrennung der Probe anders als bei der klassischen Gelelektrophorese, in einer dünnen Kapillare erfolgt.

In der Forensik hat die Kapillarelektrophorese einen hohen Stellenwert, da sie gegenüber der klassischen 2D-Gelelektrophorese einige bedeutsame Vorteile aufweist. Zum einen handelt es sich hierbei um ein automatisiertes Verfahren mit relativ hohem Probendurchsatz, wodurch Analysen schnell, kostengünstig und mit hoher Effizienz durchgeführt werden können. Zeitgleich zur Analyse der Daten können die Ergebnisse der Auftrennung auf einem Monitor betrachtet werden. Die Rohdaten können nachbearbeitet werden und es lassen sich sogar quantitative Aussagen treffen, was mit der klassischen Gelelektrophorese nur begrenzt möglich ist.

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Kapillarelektrophorese handelt es sich um den ABI

PRISM ™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Weiterstadt). Abweichend vom Protokoll wurde in dieser Arbeit das Filterset D verwendet.

3.2.5. Sequenzierung

Zur Bestimmung von Nukleotidsequenzen wurde das Verfahren des Kettenabbruchs nach Sanger et al. (1977) angewandt. Auf einzelsträngige DNA wird dabei ein sequenzspezifischer Primer hybridisiert, welcher als Startpunkt für eine DNA-Polymerase dient. Die Polymerisation des komplementären Stranges erfolgt bis zum Abbruch der DNA-Synthese nach Einbau eines Didesoxynukleotides.

3.2.6. Restriktionsverdauung

Die Ansätze für den Restriktionsverdau wurden in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Darin enthalten waren

5,0µl PCR-Amplifikat

0,2µl BSA

2,0µl Puffer

0,1µl Restriktionsenzym (10 U/µl) HspII (Promega)

12,7µl Aqua bidest.

Zunächst wurde 60min bei 37°C inkubiert und anschließend das Enzym 15min bei 75°C inaktiviert. Das Ergebnisse des Enzymverdaus wurde durch elektrophoretische Auftrennung im Polyacrylamidgel und anschließende Silberfärbung sichtbar gemacht.

4. Ergebnisse

4.1. Analyse mitochondrialer SNPs

4.1.1. Singleplex mitochondrialer SNPs

Ziel des ersten Teils der Arbeit war es, die Methode des SNP-Nachweises mit Hilfe des SNaPshot-Kits zu etablieren. Hierbei lag der Fokus zunächst bei mitochondrialer DNA.

Die ausgewählten SNPs lagen innerhalb der beiden hypervariablen Kontrollregionen HVR I und II der mitochondrialen DNA an den Positionen 73, 152, 247, 302, 16069 und 16224. Beim Lokus 302 der HVR II handelt es sich eigentlich nicht um einen klassischen SNP, als vielmehr einen Längenpolymorphismus. Ein Individuum kann an dieser Position entweder die Base Adenin haben, oder eine Inversion von 1-2 zusätzlichen Cytosin-Basen. Das SNaPshot-Kit detektiert jedoch nur, ob eine Inversion C vorliegt (Nachweis des Nukleotid C) oder ob die Wildform Adenin an dieser Position existiert (Nachweis des Nukleotids A). Es lässt sich hiermit nicht unterscheiden, ob das Individuum eine Inversion einer oder zwei C-Nukleotide hat. Aufgrund der Verschiedenartigkeit dieses Sequenzbereichs bezeichnet man ihn als Lokus 302/309.1.

Die Abbildungen 4.1 und 4.2 verdeutlichen die Lage der einzelnen SNPs auf dem jeweiligen DNA-Template. Die Sequenzen der Primer für sowohl PCR als auch SNaPshot-Ansatz wurden analog zu Morley et al. (1997) ausgewählt. Die Verlängerung des Oligonukleotides durch einen unspezifischen Poly(T)-Schwanz am 5'-Ende wurde in dieser Arbeit übernommen, um durch die somit veränderte Mobilität des Primers in der Kapillarelektrophorese die eindeutige Zuordnung des jeweils nachgewiesenen SNPs zu ermöglichen.

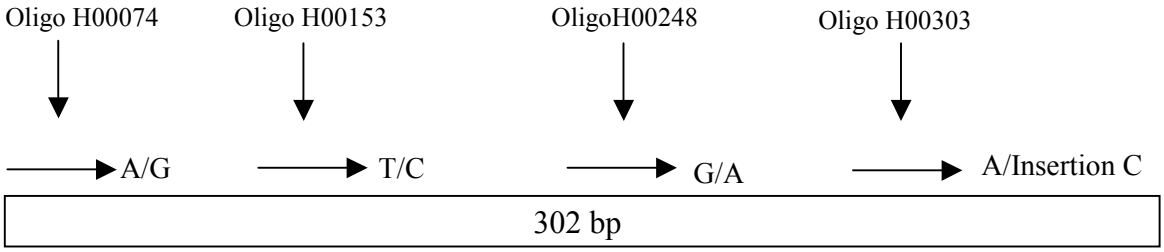


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Lage der mt-SNPs innerhalb des PCR-Fragments der HVR II . Angegeben ist der jeweils bestehende Polymorphismus und der benötigte Oligonukleotid.

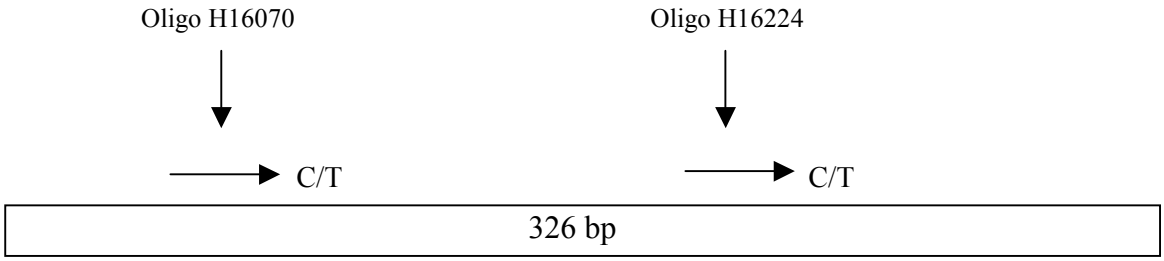


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Lage der mt-SNPs innerhalb des PCR-Fragments der HVR I . Angegeben ist der jeweils bestehende Polymorphismus und der benötigte Oligonukleotid.

Anfangs wurde pro PCR-Ansatz nur ein Abschnitt der hypervariablen Region durch das jeweilige Primerpaar amplifiziert, welches durch Gelelektrophorese und anschließender Silberfärbung nachgewiesen wurde (siehe Abb. 4.3)

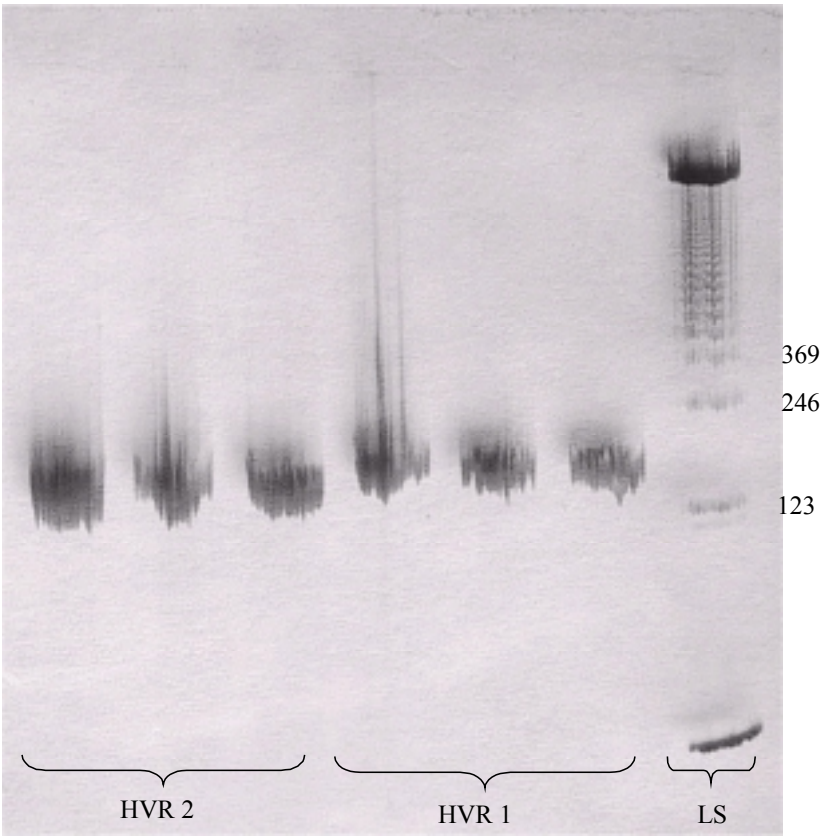


Abbildung 4.3: Polyacrylamidgel der Amplikons der hypervariablen Regionen HVR I und II der mt-DNA

Jeder der sechs Oligonukleotide wurde einzeln überprüft und stellte sich, wie in den Abbildungen 4.4-4.9 ersichtlich, dar. Der Pfeil markiert den nachgewiesenen SNP. Weitere rote Peaks resultieren aus dem Längenstandard, der jeder Analyse hinzugefügt wurde. Angaben zu Allelfrequenzen wurden von EMPOP (European mtDNA Population Database, Rechtsmedizin Insbruck) in einer persönlichen Mitteilung zu Verfügung gestellt. Die vertikale Achse repräsentiert die Intensität der gemessenen Fluoreszenz (rfu), während die horizontale Achse die zunehmende Molekulargröße (bp) aufzeigt.

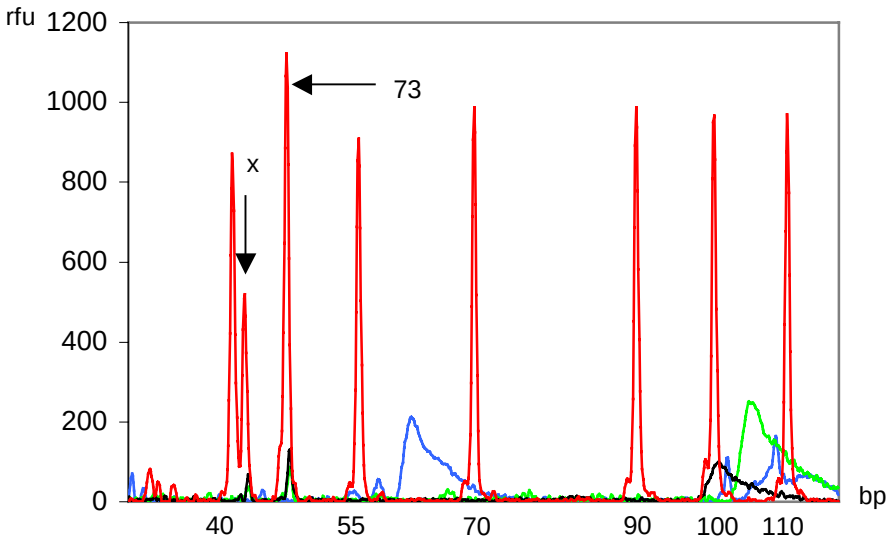


Abbildung 4.4: Untersuchung des Lokus 73 der HVR II der mt-DNA

Nachweis des Nukleotid Thymin an der Position 73 der HVR II. Das „x“ markiert einen unspezifischen Peak

Polymorphismus: A → G

Allelfrequenzen: 0.435 A : 0.564 G (Verteilung unter 273 österreichischen Kaukasiern),
(European mtDNA Population Database, EMPOP, 2003, persönliche Mitteilung)

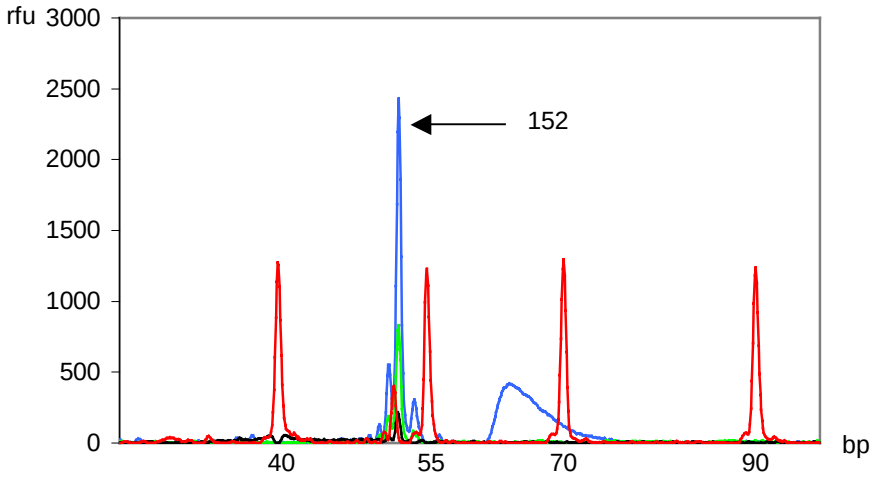


Abbildung 4.5: Untersuchung des Lokus 152 der HVR II der mt-DNA

Nachweis des Nukleotids Cytosin an der Position 152 der HVR II der mt-DNA.

Polymorphismus: T → C

Allelfrequenzen: 0,806 T : 0,194 C (Verteilung unter 273 österreichischen Kaukasiern),
(European mtDNA Population Database, EMPOP, 2003, persönliche Mitteilung)

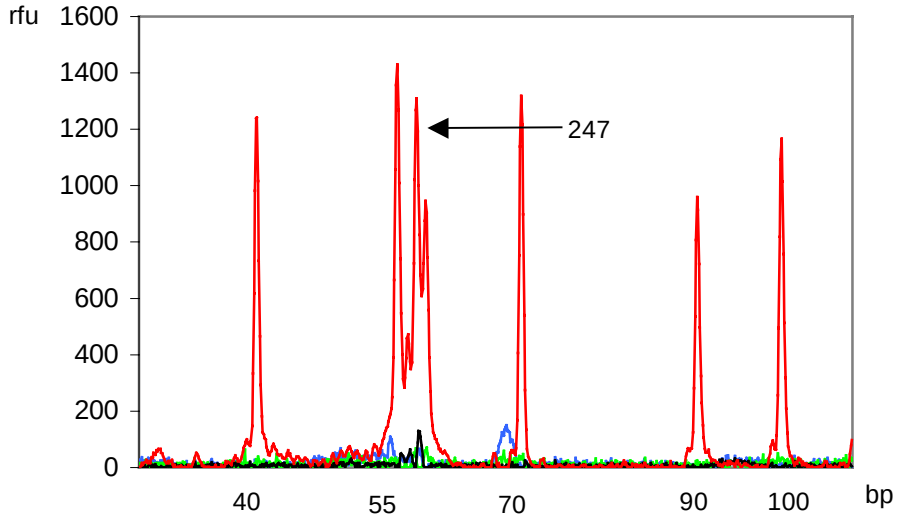


Abbildung 4.6: Untersuchung des Lokus 247 der HVR II der mt-DNA

Nachweis des Nukleotids Thymin an der Position 247 der HVR II der mt-DNA.

Polymorphismus: G → A

Allelfrequenzen: 0.989 G : 0.011A (Verteilung unter 273 österreichischen Kaukasiern),
(European mtDNA Population Database, EMPOP, 2003, persönliche Mitteilung)

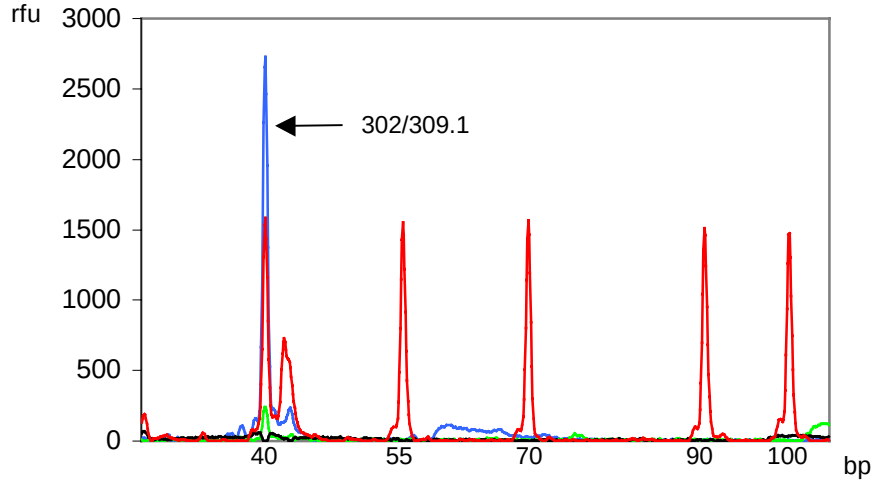


Abbildung 4.7: Untersuchung des SNPs 302/309.1 der HVR II der mt-DNA

Nachweis des Nukleotids Guanin an der Position 302 der HVR II der mt-DNA.

Polymorphismus: A; Insertion C

Allelfrequenzen: 0.443 A : 0.557 C (Verteilung unter 273 österreichischen Kaukasiern),
(European mtDNA Population Database, EMPOP, 2003, persönliche Mitteilung)

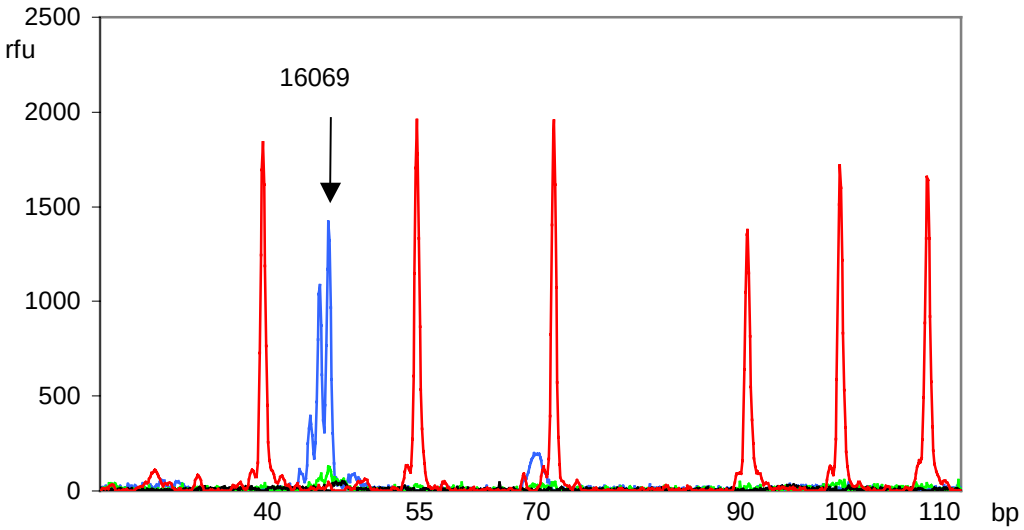


Abbildung 4.8: Untersuchung des Lokus 16069 der HVR I der mt-DNA

Nachweis des Nukleotids Guanin an der Position 16069 der HVR I der mt-DNA.

Polymorphismus: C → T

Allelfrequenzen: 0.916 C : 0.084 T (Verteilung unter 273 österreichischen Kaukasiern),
(European mtDNA Population Database, EMPOP, 2003, persönliche Mitteilung)

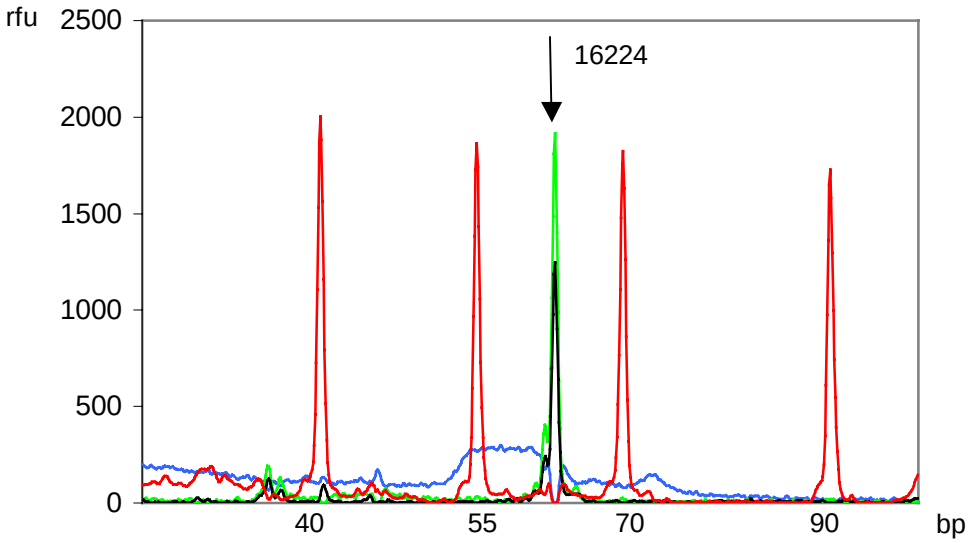


Abbildung 4.9: Untersuchung des Lokus 16224 der HVR I der mt-DNA

Nachweis des Nukleotids Adenosin an der Position 16224 der HVR I der mt-DNA.

Polymorphismus: C → T

Allelfrequenzen: 0.916 C : 0.084 T (Verteilung unter 273 österreichischen Kaukasiern),
(European mtDNA Population Database, EMPOP, 2003, persönliche Mitteilung)

Die Farben blau (G), sowie rot (T) stellten sich im Diagramm besonders gut und klar dar, wohingegen der Nachweis der ddNTPs A (grün) und C (schwarz) in einem doppelfarbigen Peak resultierte. War ein A zu erwarten, so sah man in der Abbildung zwei zumeist gleich intensive, sich überlagernde Peaks in schwarz und grün. Ein gleichermaßen roter und schwarzer Peak erschien hingegen, wenn es sich bei der in der Minisequencing Reaktion eingebaute ddNTP um ein C handelte.

Um die Richtigkeit der durch das Kit nachgewiesenen SNPs zu überprüfen wurden einige DNA-Proben exemplarisch sequenziert. Hierbei konnte bei allen untersuchten Genloki eine Übereinstimmung der Ergebnisse von SNaPshot-Kit und Sequenzierung gefunden werden.

4.1.2. Multiplex mitochondrialer SNPs

Um zu überprüfen, ob der Kit auch für Multiplexansätze geeignet ist, wurde die Anzahl der innerhalb einer hypervariablen Region gelegenen Oligonukleotide pro Ansatz erhöht. Die Teilvolumina von Ready Reaction Mix, DNA sowie der einzelnen Oligonukleotide wurden hierbei beibehalten. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe, die in Abbildung 10 a-c dargestellt sind, zeigen, dass es gelungen ist, einen Quadruplex der HV-Region II herzustellen.

Des weiteren konnte das unregelmäßige Auftreten eines unspezifischen Peaks ca. an der Position 43 der Chromatogramme beobachtet werden. In einigen Fällen war dieser Peak rot, in anderen blau. Das Phänomen wurde insgesamt häufiger bei der Verwendung des Oligos H0074 beobachtet, wobei dieses Auftreten unabhängig von Aufreinigung des PCR-Produktes, Konzentration der Oligos oder eingesetzter DNA-Menge war. Bei Versuchen mit der gleichen DNA wurde jedoch immer die selbe Farbe des Peaks detektiert. In den Abbildungen 4.10 b-c ist dieser unspezifische Peak mit einem „x“ markiert.

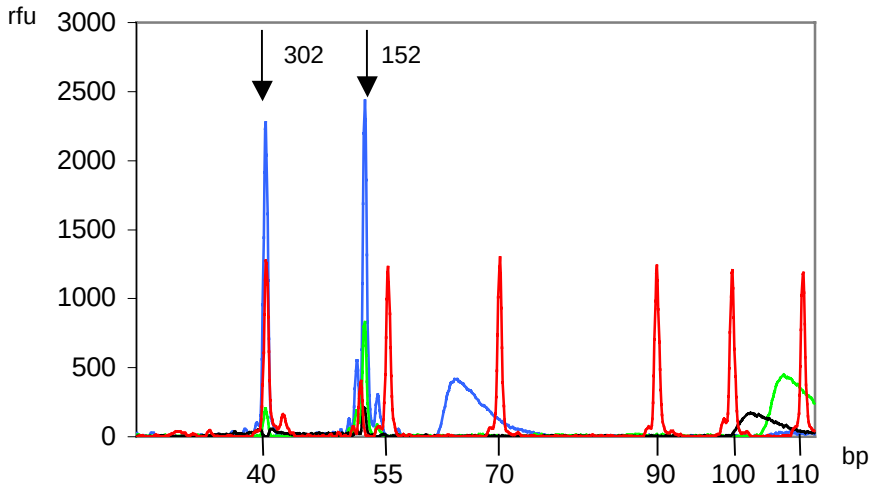


Abbildung 4.10 a: Simultane Untersuchung der SNPs 302/309.1 und 152 der HVR II der mt-DNA.
Duplex der mt-SNPs an den Positionen 302 und 152 der HVR II. Nachweis des Nukleotids Guanin bei beiden Polymorphismen.

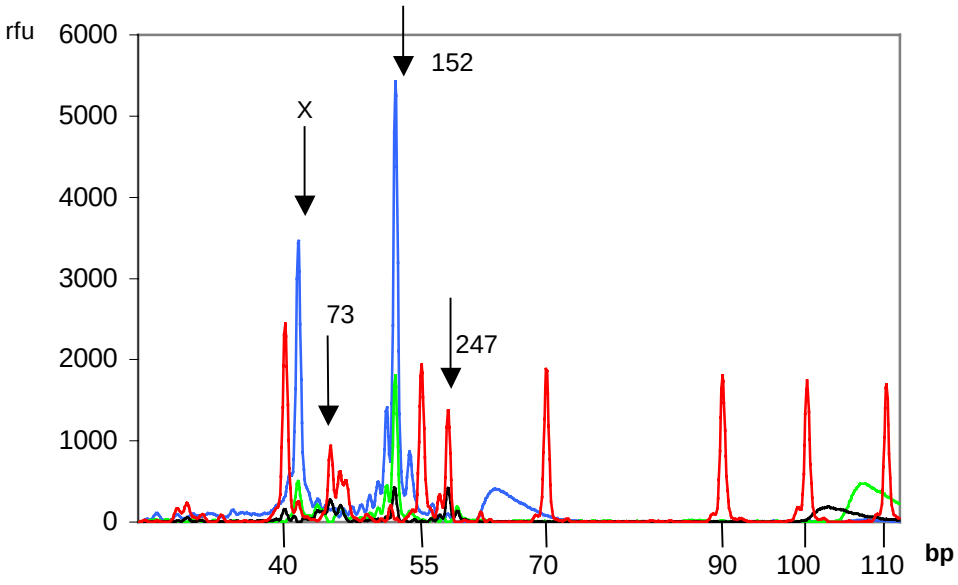


Abbildung 4.10 b: Simultane Untersuchung der 73, 152 und 247 der HVR II der mt-DNA.
Triplex der mt-SNPs an den Positionen 73, 152 und 247 der HVR II. Nachweis des Nukleotids Guanin an der Position 152, sowie des Nukleotids Thymin an den Positionen 73 und 247. Der Pfeil X markiert einen unspezifischen Peak.

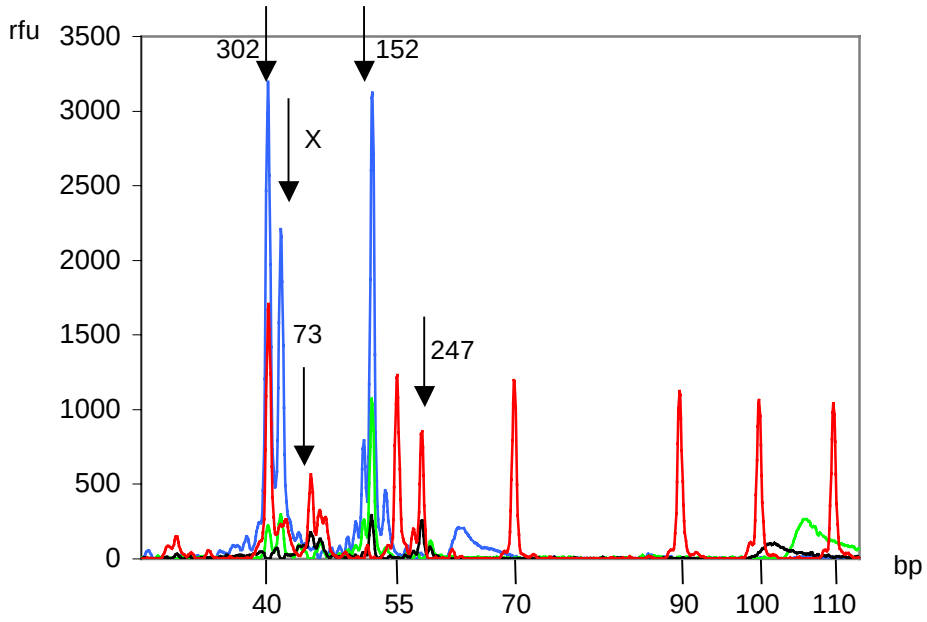


Abbildung 4.10 c: Simultane Detektion der Loki 302, 73, 152 und 247 der HVR II der mitochondrialen DNA. Quadruplex der mt-SNPs an den Positionen 302, 73, 152 und 247 der HVR II. Nachweis des Nukleotids Guanin an den Positionen 302 und 152, sowie des Nukleotids Thymin an den Positionen 73 und 247. Der Pfeil X markiert einen unspezifischen Peak.

Im Anschluss an den Multiplex von SNPs innerhalb eines PCR-Amplifikates sollte überprüft werden, ob auch ein Multiplex von SNPs unterschiedlicher DNA-Abschnitte möglich sein würde. Hierfür wurden beide hypervariablen Regionen in einem PCR-Ansatz amplifiziert. Zum Nachweis der beiden PCR-Produkte wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt (siehe Abbildung 4.11).

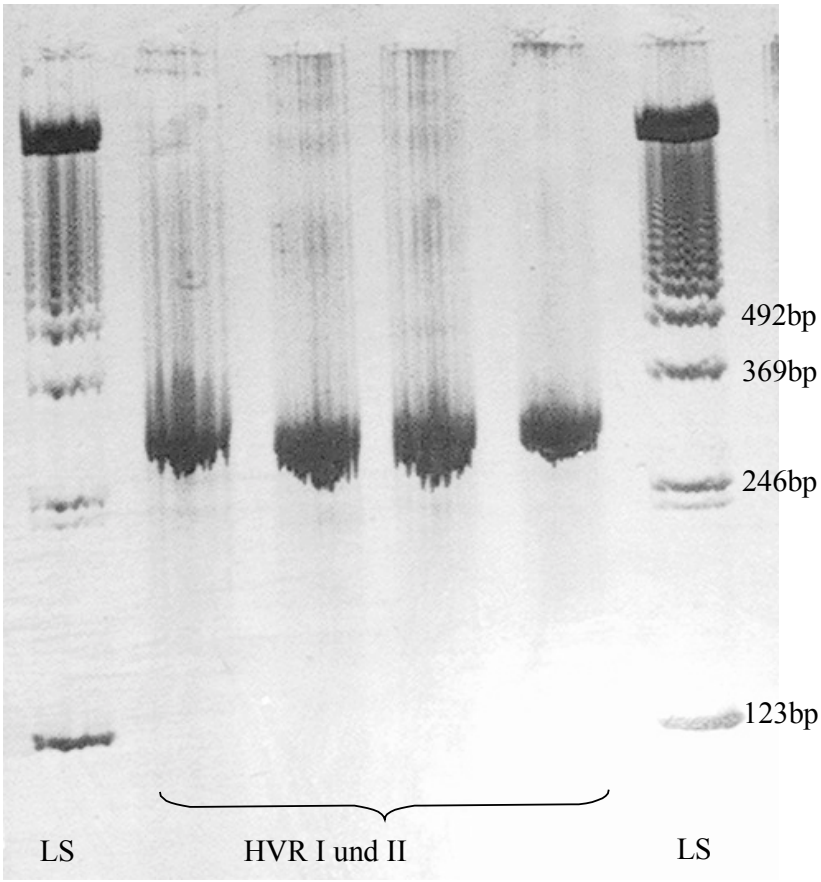


Abbildung 4.11: Gelelektrophorese der in einem Ansatz angefertigten PCR-Produkte der hypervariablen Regionen I und II (HVR I und II). LS = Längenstandard

Der Reaktion wurden Oligonukleotide von beiden DNA-Abschnitten hinzugefügt. Wie aus der Abbildung 4.12 ersichtlich war es möglich, einen Multiplexnachweis mit insgesamt sechs SNPs durchzuführen. Der SNP 73, der in den vorherigen Multiplexen noch zumindest in mittlerer Intensität nachweisbar war, konnte im Hexaplex nur mit Mühe identifiziert werden, da die Menge an unspezifische Peaks die Auswertungen deutlich erschwerte. Je mehr Oligos der Reaktion hinzugefügt wurden, umso häufiger konnte das Auftreten kleiner unspezifischer Peaks beobachtet werden, insbesondere dann, wenn mehr als ein Quadruplex angefertigt wurde.

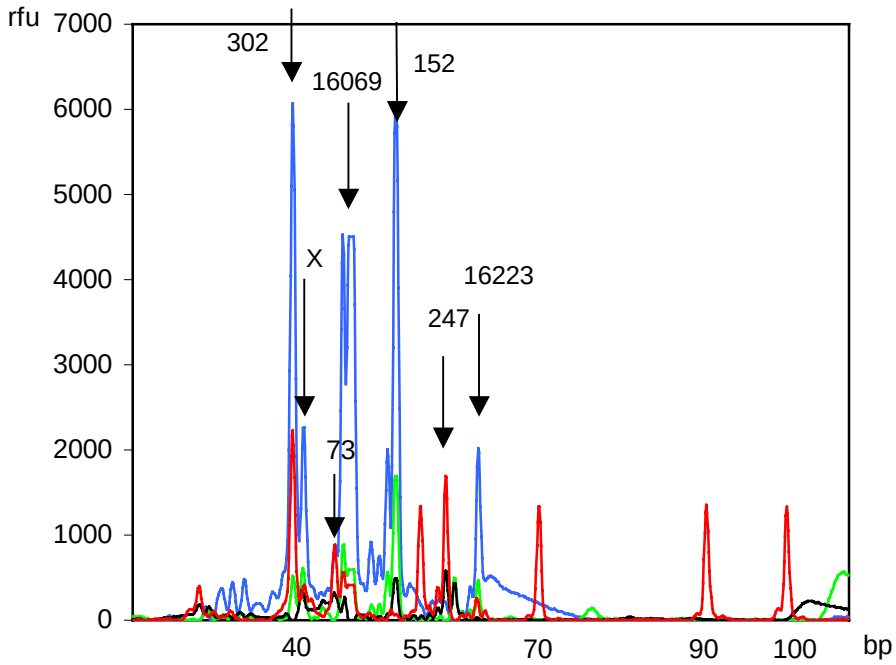


Abbildung 4.12: Simultane Detektion der Loki 302, 73, 152 und 247 der HVR II sowie der Loki 16069 und 16224 der HVR I der mitochondrialen DNA.

Multiplex der SNPs 302/309.1, 73, 152, 247, 16069 und 16223 der Regionen HVR I und II. Nachweis des Nukleotids Guanin an den Positionen 302/309.1, 16069, 152 und 16223. sowie des Nukleotids Thymin an den Positionen 73 und 247.Der SNP an der Position 73 ist nur noch schwach identifizierbar. Der Pfeil X markiert einen unspezifischen Peak.

Die Teilvolumina der Reagenzien für den Multiplexansatz wurden zunächst analog dem Singleplex beibehalten. Doch auch durch eine Veränderung der Teilkonzentrationen der einzelnen Oligonukleotide gelang es nicht in allen Fällen, alle sechs Oligonukleotide im gleichen Ansatz nachzuweisen.

Die Sequenzierung wurde auch in diesem Fall stichprobenartig zur Bestätigung der Ergebnisse durchgeführt. Es konnten jedoch in einigen Fällen von der Sequenzierung abweichende Resultate gefunden werden, oder ein fehlerhaftes Ergebnis fiel bereits in den Auswertungen der Kapillarelektrophorese auf. Dies äußerte sich in der Form, dass ein Peak zwar an der richtigen Stelle detektiert wurde, jedoch der nachgewiesene Nukleotid nicht zur DNA-Matrize passte. Zwar ereignete sich dies nur in Einzelfällen, jedoch muss es bezüglich der Spezifität des Kits bemerkt werden.

4.2. Untersuchung stark degradierter DNA

Es wurden vier DNA-Proben, die mit Hilfe der gängigen STR-Systeme schlecht oder gar nicht analysiert werden konnten, mit dem SNaPshot-Kit untersucht. Bei den untersuchten Proben handelte es sich um Knochenfunde, einen Zigarettenstummel, einen Blutabstrich von der Hand eines Opfers sowie eine Blutprobe nach unsachgemäßer Lagerung. Es war davon auszugehen, dass die DNA in stark degradiertem Zustand vorlag. Es sollte überprüft werden, ob die in Kapitel 4.1 untersuchten mt-SNPs auch in schwierig analysierbaren Proben noch nachzuweisen sind.

Die Untersuchungen der Knochenprobe konnten problemlos durchgeführt werden. Hierbei wurden insbesondere Duplexe und Triplexe von mt-SNPs innerhalb einer, als auch aus beiden hypervariablen Regionen nachgewiesen. Sogar das Anfertigen eines Hexaplexes war möglich. Besonders zu bemerken war bei dieser Probe auch die Detektion von Heteroplasmie an der Position 152. Dies fiel dadurch auf, dass die Kapillarelektrophorese an dieser Position sowohl einen blauen als auch einen grünen Peak übereinander aufgezeichnet hatte (Abbildung 4.13). Eine nachfolgende Sequenzierung konnte dieses Resultat bestätigen.

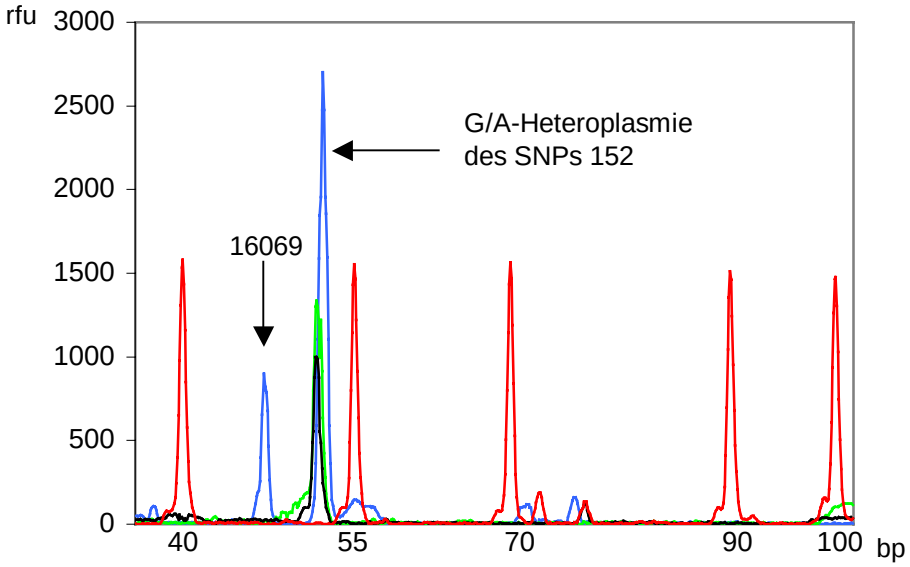


Abbildung 4.13: Nachweis einer Heteroplasmie am Lokus 152 der mitochondrialen DNA.
Detektiert wurden die Nukleotide Guanin (blau) und Adenin (grün-schwarz) en der Position 152 der HVR II der mt-DNA. In dieser Probe wurde außerdem noch der mt-SNP 16069 detektiert.

Bei den übrigen Spuren konnten im Polyacrylamidgel jedoch erst nach Durchführung einer Re-PCR mit erneuten 30 Zyklen Banden nachgewiesen werden. Hierbei wurden die gleichen Primer und dasselbe Temperaturprogramm verwendet, wie beim ersten PCR Durchlauf. Im Falle der unsachgemäß gelagerten Blutprobe wurde allerdings auch dann keine Bande sichtbar.

Obwohl davon ausgegangen werden musste, dass sich durch die Re-PCR vermehrt eine fehlerhafte Amplifikation der relevanten DNA-Fragmente ergeben würde, konnte bei allen Problemspuren, mit Ausnahme der Blutprobe, ein erfolgreicher SNaPshot durchgeführt werden. Jedoch zeigten sich deutliche Unterschiede der Sensitivität einiger SNPs. Der SNP 16069 ließ sich insgesamt am häufigsten darstellen, wenn auch nicht in allen untersuchten Proben. Auch die Positionen 247 und 302/309.1 waren in Einzelfällen nachweisbar. Dem gegenüber wurden auch falsche Peaks nachgewiesen, d.h. ein Nukleotid, welches an dieser Position nicht vorkommt. Insbesondere an der Position 152 konnte dies beobachtet werden. In allen Fällen erfolgte die Validierung der Ergebnisse durch Sequenzierung. Hierbei wurden zum größten Teil Übereinstimmungen der Ergebnisse von Sequenzierung und SNaPshot gefunden. Lediglich bei den SNPs, die offensichtlich nicht dem gefundenen Resultat entsprechen konnten, kamen auch die Analysen der Sequenzierung nicht zu einem übereinstimmenden Ergebnis.

4.3. Analyse Y-chromosomaler SNPs

4.3.1. Y-chromosomaler Singleplex

Ziel des zweiten Teils der Arbeit war es, forensisch relevante SNPs des Y-Chromosoms mit Hilfe des SNaPshot Kits nachzuweisen. Die ausgewählten SNPs lagen innerhalb der nicht-kodierenden Region des Y-Chromosoms: SRY-2627, SRY-1532, M9, RBF5, M89, M45, sY81 und TSC 031703. Im Gegensatz zu den Versuchen mit mitochondrialer DNA, bei der das Konzentrationsoptimum der Oligos sehr schnell einzustellen war, mussten die Konzentrationen der Y-chromosomalen Oligos jedoch wesentlich sensitiver abgestimmt werden.

Zunächst wurde zu jedem einzelnen Y-chromosomalen SNP der jeweilige DNA-Abschnitt durch die betreffenden Primer amplifiziert. Im Polyacrylamidgel konnte in allen Fällen ein

PCR-Produkt nachgewiesen werden, welche sich, wie in Abbildung 4.14 ersichtlich, darstellten.

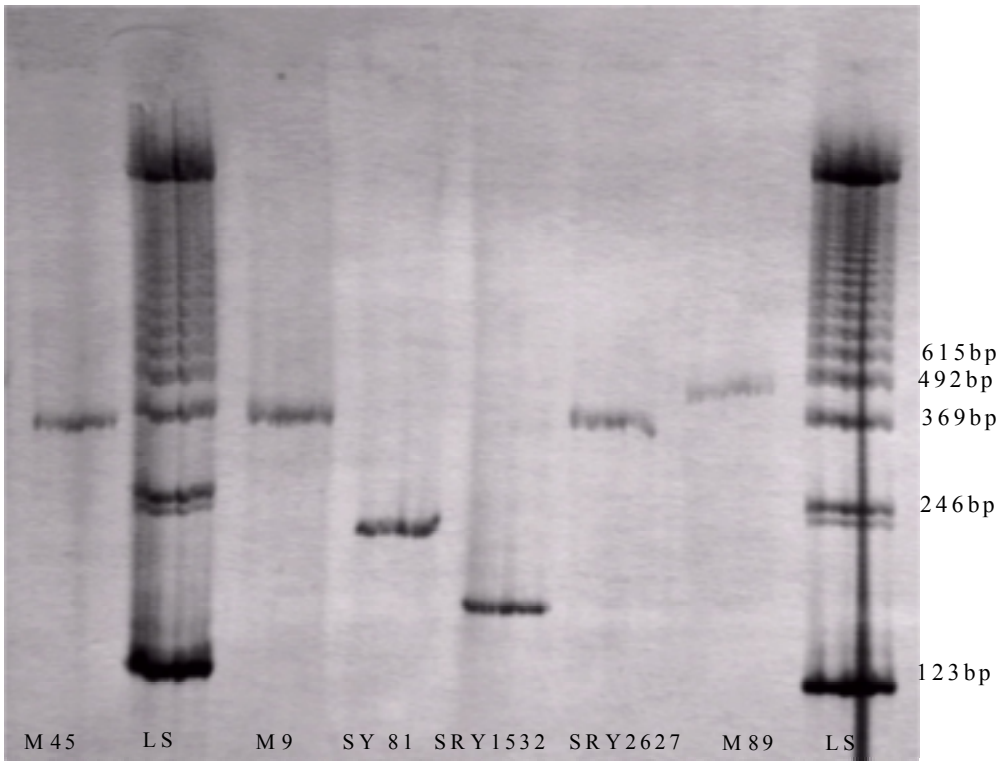


Abbildung 4.14: Polyacrylamidgel der PCR-Produkte der Y-chromosomalen SNPs M45, M9, SY81, SRY-1532, SRY-2627 und M89. LS= Längenstandard.

Anschließend wurde der SNP Nachweis mit Hilfe des SNaPshot Kits durchgeführt. Wie aus den Abbildung 4.15-4.19 ersichtlich wird, gelang es einen Y-chromosomalen Singleplex der SNPs SRY-2627, SRY-1532, M9, RBF5 sowie M89 durchzuführen. Bei den ebenfalls untersuchten Y-SNPs sY81 sowie M45 gelang der Nachweis nicht.

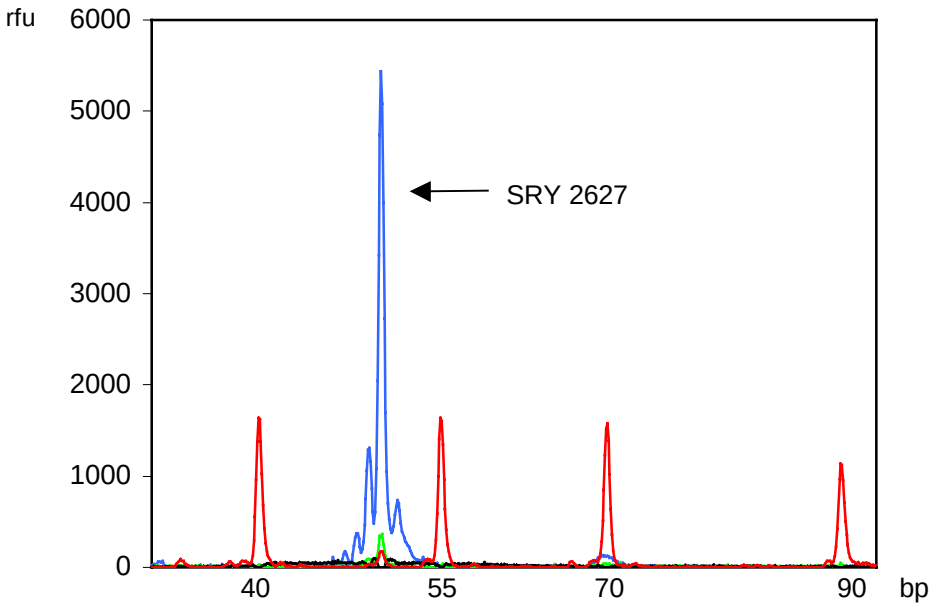


Abbildung 4.15: Detektion des y-chromosomalen SNPs SRY 2627. Nachweis des Nukleotids Guanin.

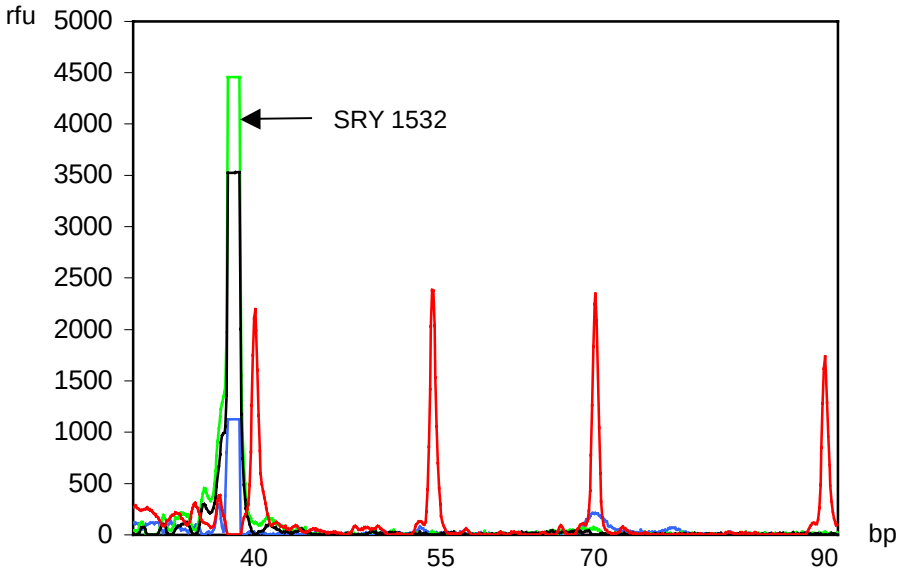


Abbildung 4.16: Detektion des y-chromosomalen SNPs 1532. Nachweis des Nukleotids Adenin.

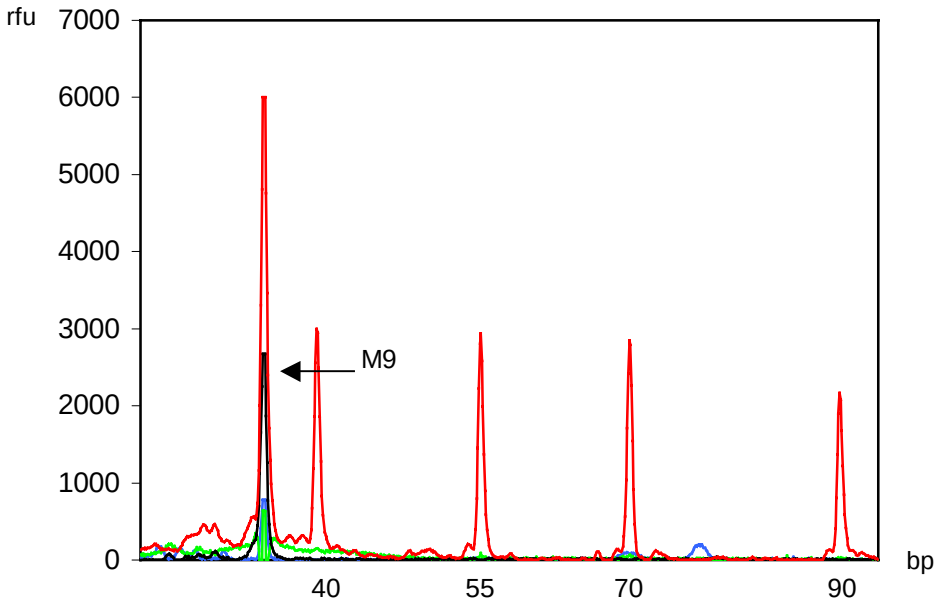


Abbildung 4.17: Detektion des y-chromosomalen SNPs M9. Nachweis des Nukleotids Cytosin.

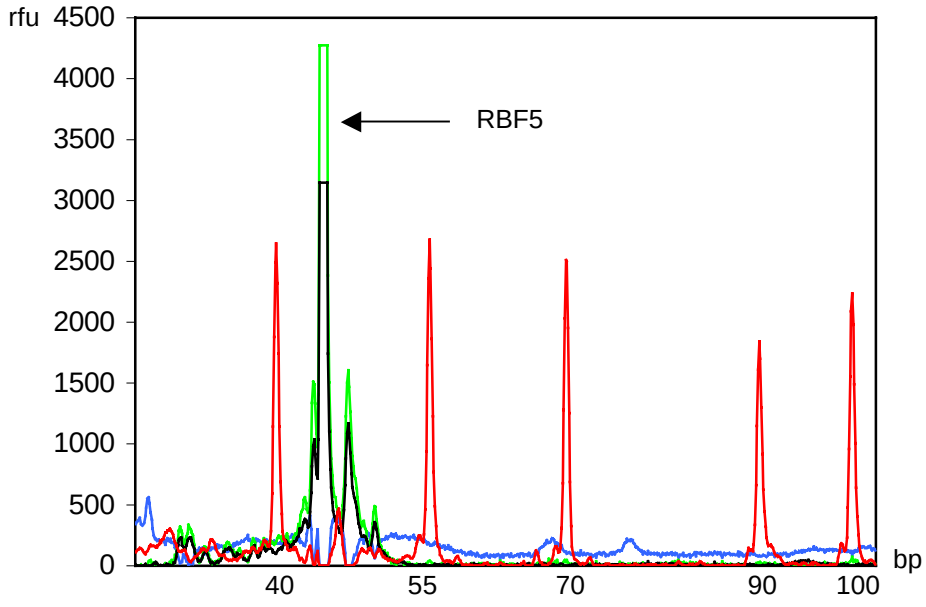


Abbildung 4.18: Detektion des y-chromosomalen SNPs. Nachweis des Nukleotids Adenin .

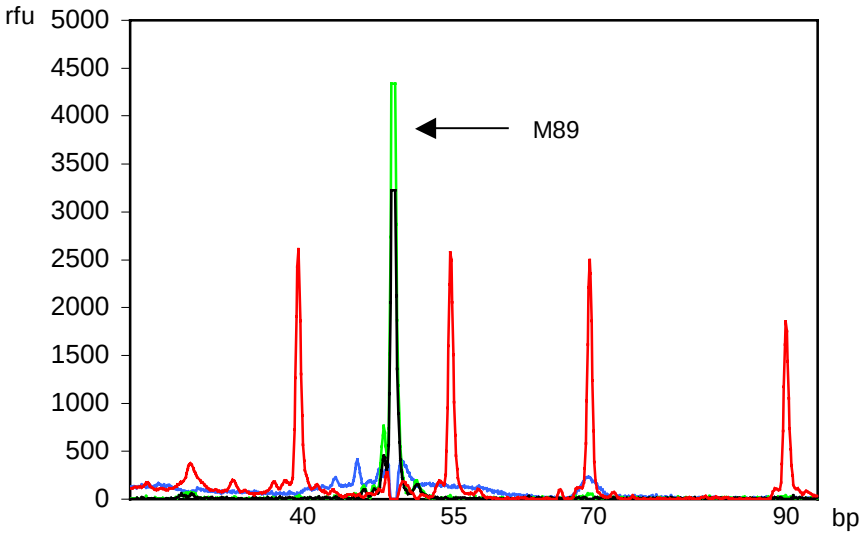


Abbildung 4.19: Detektion des y-chromosomalen SNPs. M89. Nachweis des Nukleotids Adenin.

Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse durch Bildung von Primer-Dimeren oder unspezifischer Anlagerung des Oligonukleotids an die DNA-Matritze wurden Leerproben angefertigt, sowie Proben mit weiblicher DNA. Da in allen Fällen negative Ergebnisse resultierten, konnte derartige Unspezifität bei allen Primern sowie Oligonukleotiden weitgehend ausgeschlossen werden.

Exemplarisch wurden einige Proben parallel mit dem SNaPshot-Kit und durch Sequenzierung untersucht. Dabei deckten sich in allen Fällen die Ergebnisse beider Verfahren.

Es wurde in dieser Arbeit noch ein weiterer SNP untersucht, welcher der Datenbank des SNP-Consortiums entnommen wurde, der SNP TSC 031703. Es konnte ein eindeutiges PCR-Produkt nachgewiesen werden und auch der Nachweis durch das Kit schien problemlos durchführbar zu sein (siehe Abbildung 4.20). Der detektierte Peak erschien in allen untersuchten Proben immer an gleicher Stelle. In allen Proben wurde die Base Adenin nachgewiesen. Das SNP-Consortium gibt jedoch für diese Position einen C→ G Polymorphismus an, was auch mit den durch Sequenzierung in unseren Laboren gefundenen Ergebnissen übereinstimmt.

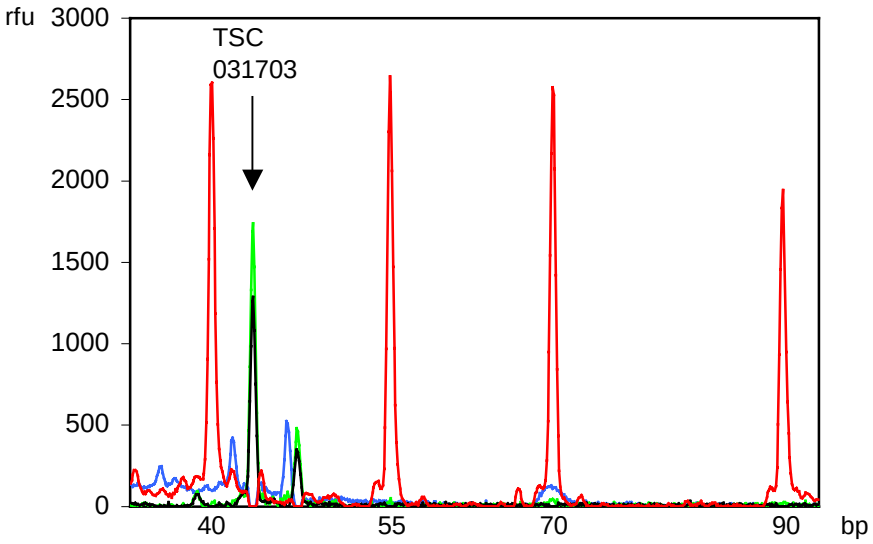


Abbildung 4.20: Detektion des y-chromosomalen SNPs TSC 031703. Nachweis des Nukleotids Adenin.

4.3.2. Y-chromosomaler Multiplex

Es wurden jeweils zwei DNA Abschnitte in unterschiedlichen Kombinationen in einem PCR-Ansatz amplifiziert und anschließend im Polyacrylamidgel durch Silberfärbung sichtbar gemacht (Abbildung 4.21). Die Kombination der Primerpaare von M9 - SRY 1532, sowie SRY 1532 - RBF5 ließen sich im Gel sehr gut darstellen. Da zudem zu diesen Y-SNPs bereits in der Literatur verhältnismäßig viele Daten zu finden sind, konzentrierten sich im weiteren Verlauf der Arbeit die Untersuchungen besonders in Richtung dieser drei SNPs.

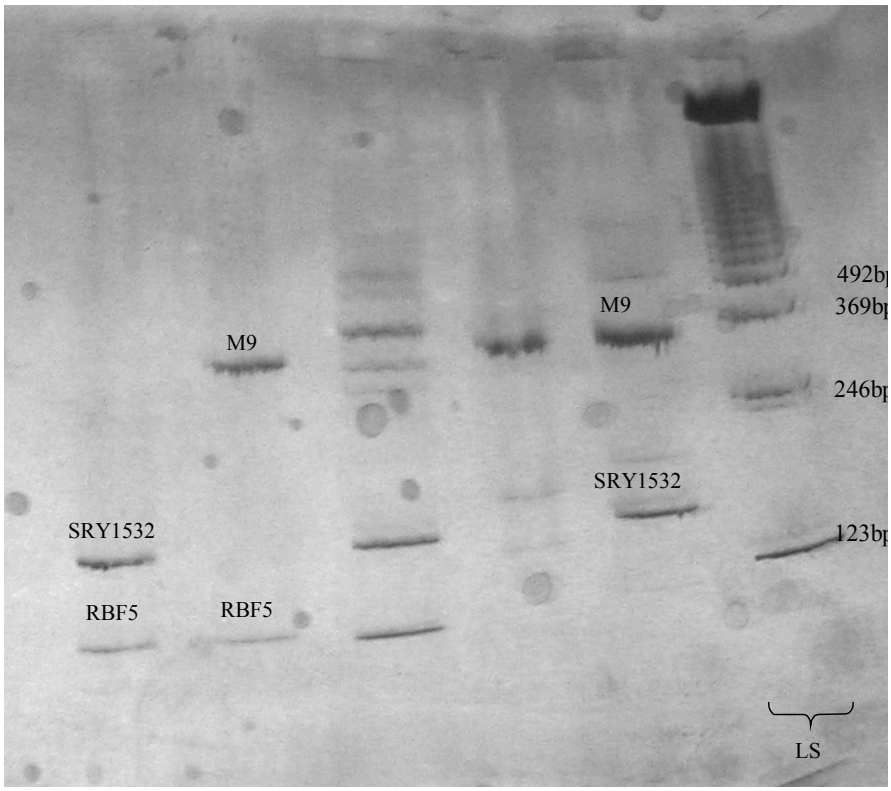


Abbildung 4.21: Polyacrylamidgel der Duplex-PCR-Produkte von drei Y-chromosomalen SNPs M9, SRY 1532 und RBF5. LS = Längenstandard.

Das PCR-Amplifikat mit M9 und SRY 1532 wurde hinsichtlich der SNPs M9 und SRY 1532 untersucht, was in der Abbildung 4.22 dargestellt wird. Analog hierzu wurden das PCR-Amplifikat mit SRY 1532 und RBF5 auf die entsprechenden SNPs hin geprüft (siehe Abbildung 4.23).

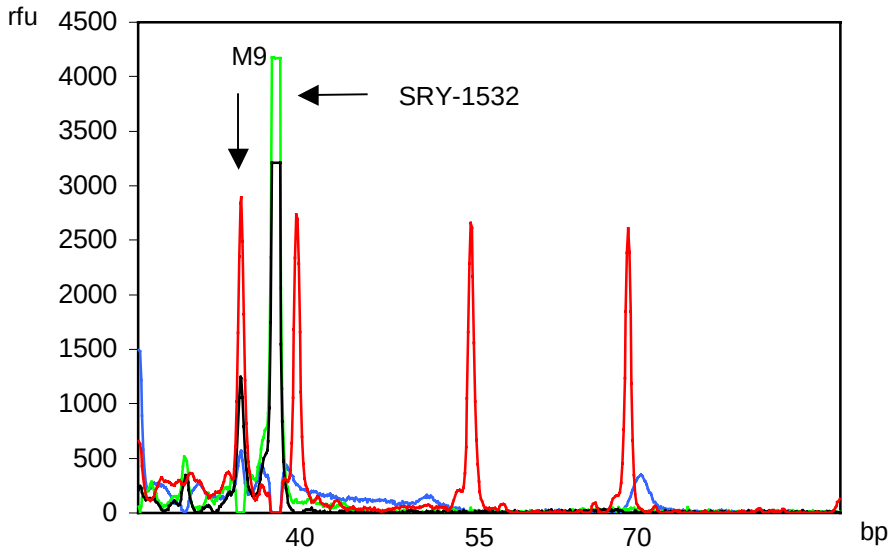


Abbildung 4.22: Simultane Detektion der y-chromosomalen SNPs M9 und SRY-1532. Nachweis der Nukleotide Cytosin beim y-chromosomalen SNP M9, sowie Adenin bei SRY-1532.

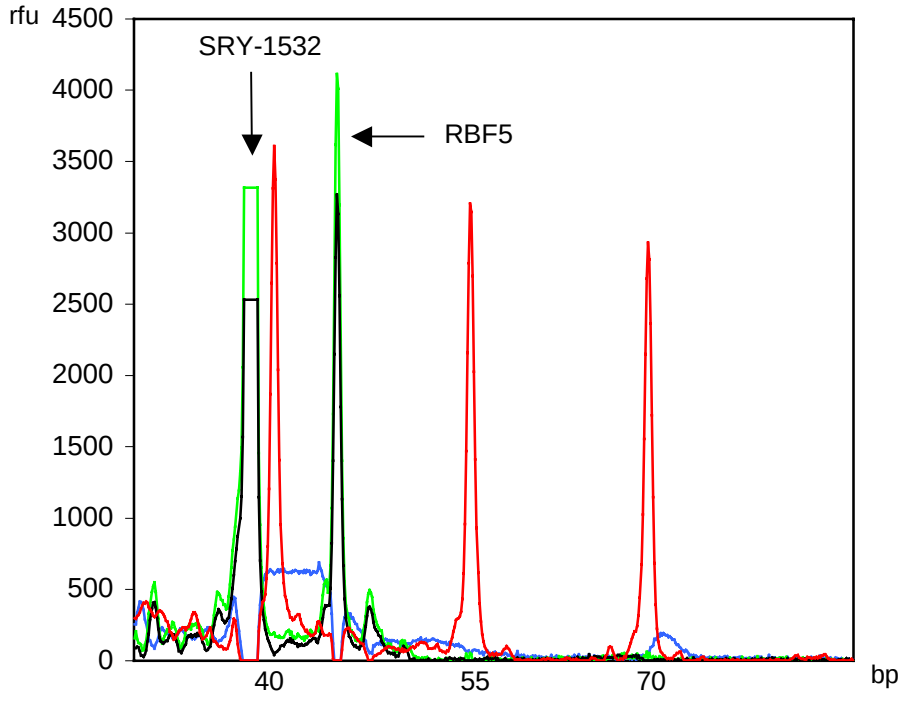


Abbildung 4.23: Simultane Detektion der y-chromosomalen SNPs SRY-1532 und RBF5. Nachweis des Nukleotid Adenin bei SRY-1532, sowie Adenin bei RBF5.

In einem weiteren Schritt sollte untersucht werden, ob sich drei Y-SNPs gleichzeitig mit dem SNaPshot Kit nachweisen lassen würden. Hierzu wurden die Primerpaare M9, SRY 1532 und Tat 1+3 zu dem gleichen PCR-Ansatz hinzugefügt. Im Polyacrylamidgel konnten auch in diesem Fall drei klar voneinander trennbare, deutliche Banden dargestellt werden. (siehe Abbildung 4.24) Ein anschließender Nachweis dieses Triplex durch das Kit konnte erfolgreich durchgeführt werden. Das Ergebnis des SNaPshots wird in der Abbildung 4.25 dargestellt.

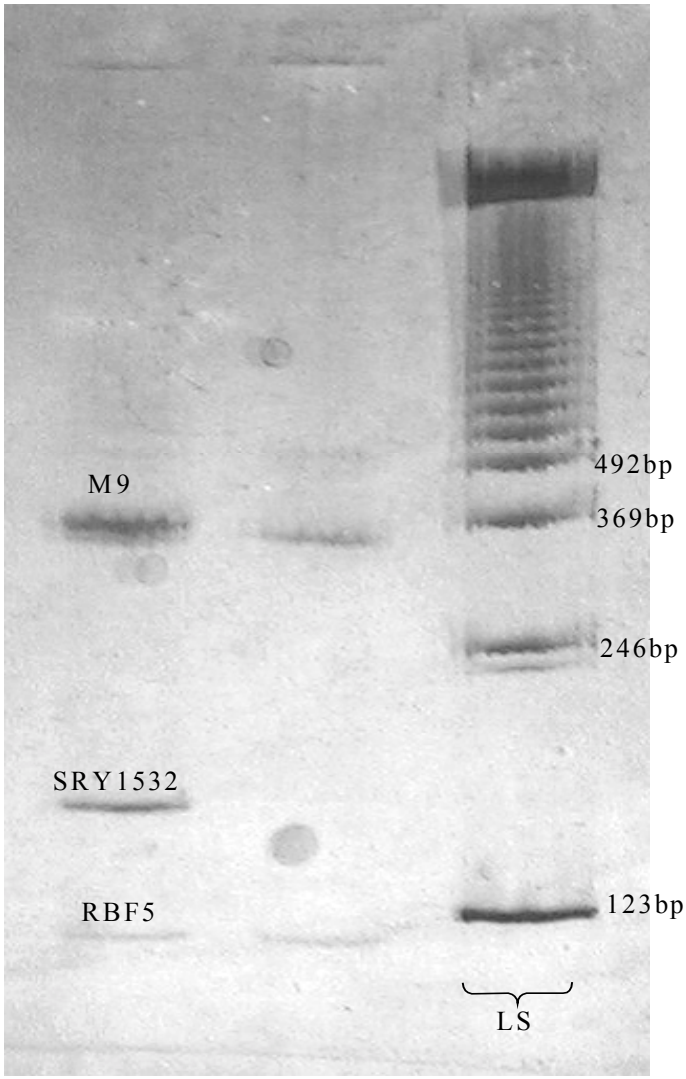


Abbildung 4.24: Polyacrylamidgel des Triplex-PCR-Produktes von M9, SRY 1532, RBF5. LS= Längenstandard.

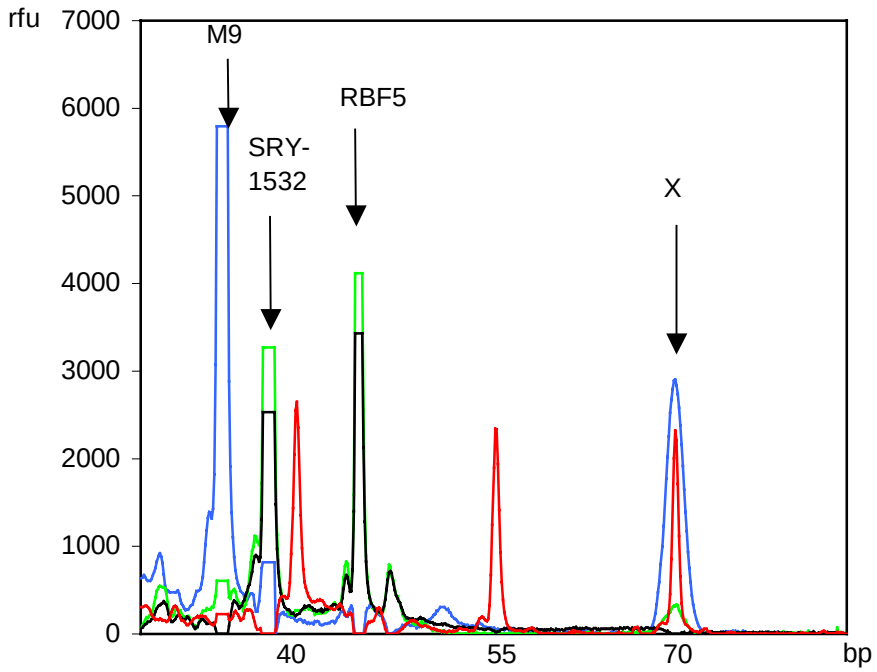


Abbildung 4.25: Simultane Detektion der y-chromosomalen SNP M9, SRY-1532 und RBF5. Nachweis der Nukleotide Guanin bei M9, sowie Adenin bei SRY-1532 und RBF5. X bezeichnet einen unspezifischen Peak

Es muss hierbei erwähnt werden, dass die Teilvolumina der jeweiligen Oligonukleotide für einen Multiplex um die Hälfte auf jeweils 0,25µl reduziert werden mussten, um ein besseres Ergebnis zu erzielen. Eine Abnahme der Intensität der Peaks konnte, wie es bei mitochondrialen Multiplexen der Fall war, nicht beobachtet werden.

Versuche, einen Quadruplex der Y-SNPs M9, SRY-1532 und RBF5 und einem weiteren der in Abschnitt 4.3.1 untersuchten Y-SNPs anzufertigen, waren nicht erfolgreich.

4.4. Männlich-weibliche Mischspuren

Zur Überprüfung der Sensitivität des Kits in Bezug auf forensisch relevante männlich-weibliche Mischspuren, wurden Proben mit immer geringer werdenden Konzentrationen an männlicher DNA hergestellt. Hierbei wurden jedoch nur mit vier der sechs Y-SNPs Experimente durchgeführt (M9, SRY-1532, SRY-2627 und RBF5), da sich diese in den vorherigen Versuchen durchweg als am verlässlichsten nachweisbar erwiesen hatten. Bei den jeweiligen SNPs konnte dabei deutliche Unterschiede bezüglich der Sensitivität

festgestellt werden. Im einzelnen wurde die Nachweisgrenze, an der bei den untersuchten SNPs gerade noch ein eindeutiger Peak nachzuweisen war, wie folgt bestimmt (Angaben jeweils Verhältnisse männliche : weibliche DNA).

M9	1:10
SRY 1532	1:40
SRY 2627	1:50
RBF5	1:200

Wie aus den Angaben deutlich wird, erwies sich der Oligonukleotid RBF5 als besonders sensitiv.

Im Anschluss sollte überprüft werden, ob sich die Ergebnisse der künstlich hergestellten männlich-weiblichen Mischspuren auch auf reale Spurenfälle übertragen lassen würde. Untersucht wurden Spuren eines Sexualdelikts, welche mit Speichelproben des mutmaßlichen Täters verglichen wurden. Die Analysen beschränkten sich hierbei auf die SNPs M9, SRY-1532 und RBF5, die jeweils einzeln, als Duplex, sowie als Triplex eingesetzt wurden. In der Speichelprobe des Täters konnten alle drei Y-SNPs sowohl einzeln, als Duplex und als Triplex dargestellt werden. Bei den Spuren vom Tatort gelang jedoch nur der Einzelnachweis, in einigen Fällen auch ein Duplex. Ein Triplex gelang bei den Spuren jedoch nicht. Abstriche von Kleidungsstücken des Opfers waren hierbei am schwierigsten zu analysieren; nur in einem Abstrich gelang der Nachweis des SNPs SRY-1532. In allen Fällen stimmten jedoch die detektierten Nukleotide der Spuren mit denen der Speichelprobe des mutmaßlichen Täters überein.

4.5. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs)

Da einige der mit dem SNaPshot-Kit untersuchten SNPs innerhalb sogenannter Palindrome liegen, war neben der Sequenzierung die Untersuchung von Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs) eine Methode zur Validierung der mit dem Kit gefundenen Ergebnisse. Hierfür wurde beispielhaft der SNP RBF5 (Zerjal et al. 1997,

Dupuy et al. 2001) herangezogen.

Der an dieser Position vorliegende T/C Polymorphismus liegt innerhalb eines Palindromes, welches durch das Restriktionsenzym Hsp92II geschnitten wird, sofern das T-Allel vorliegt. Das durch die PCR amplifizierte DNA-Fragment hat eine Länge von 112bp, welches nach erfolgreichem Restriktionsverdau in ein kurzes (ca. 28 bp) und in ein langes (ca. 84 bp) Fragment geschnitten wird. Das C-Allel bleibt nach Restriktionsverdau unverändert. Untersucht wurden insgesamt 70 Männer fast ausschließlich russischer Abstammung, da in dieser Population das seltenere C-Allel mit einer geschätzten Häufigkeit von 15% (bei deutschen Männern 0%) zu finden ist. Nahezu alle Proben wiesen erwartungsgemäß das T-Allel auf. Nur bei einem Mann war das Amplifikat gegenüber dem Restriktionsenzym resistent, wodurch bei dieser Person der Polymorphismus nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4.26).

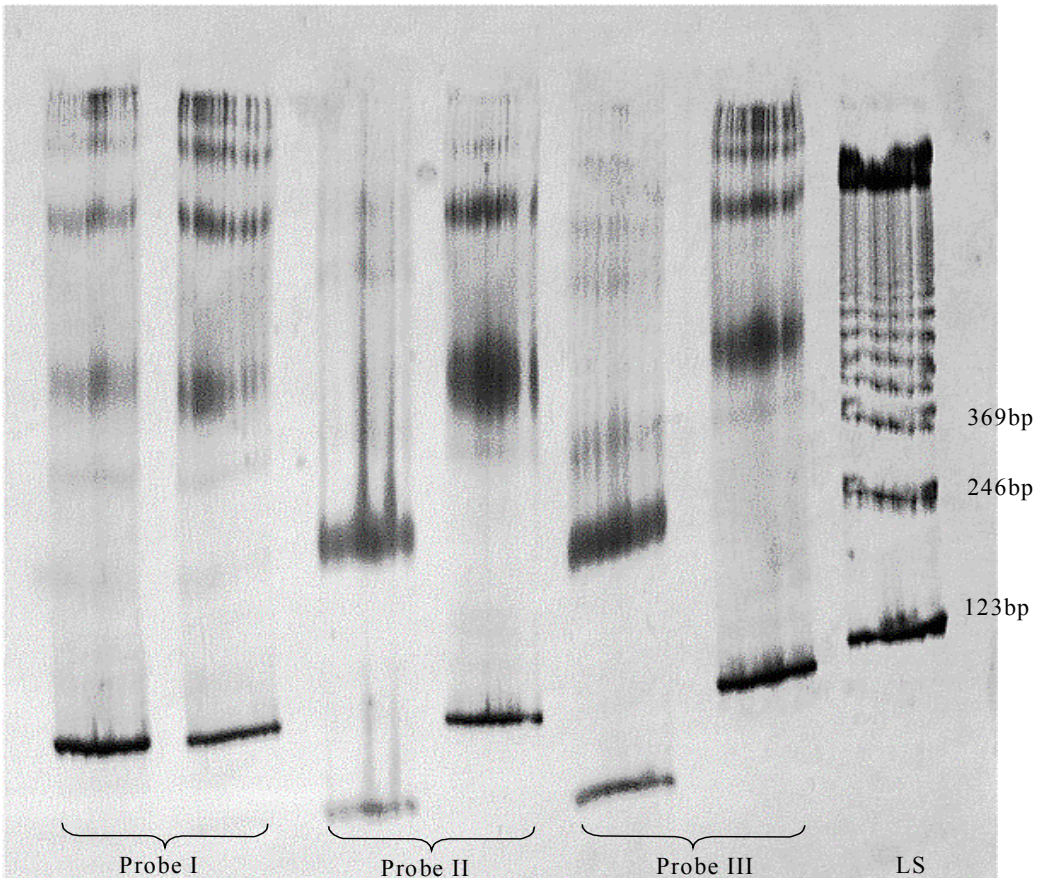


Abbildung 4.26: Gelelektrophorese des PCR-Amplifikates, welches den y-chromosomalen SNP RBF5 beinhaltet. Jeweils links wurde bei den Proben die DNA vor Zugabe des Restriktionsenzyms aufgetragen, rechts hingegen nach Zugabe des Restriktionsenzyms. Probe I weist folglich den C-Polymorphismus auf. Probe II und III haben an dieser Stelle die Base Thymin. LS= Längenstandard

Die Proben, bei denen aufgrund des Restriktionsverdaus das Nukleotid Thymin zu erwarten war, wurden anschließend in Stichproben durch das SNaPshot-Kit untersucht (Abbildung 4.27). Analog wurde mit der DNA des Mannes verfahren, bei der das Nukleotid Cytosin nachweisbar sein sollte (Abbildung 4.28). In allen Fällen stimmten die Ergebnisse der RFLP-Analytik und Kit überein.

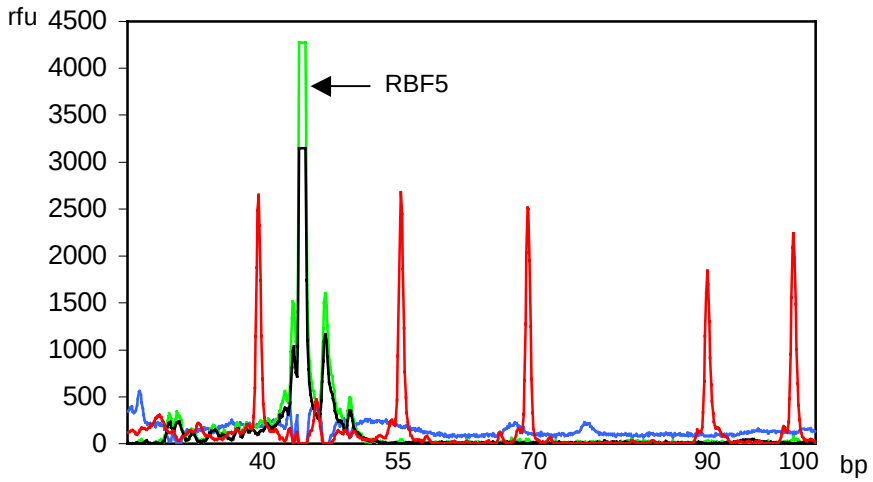


Abbildung 4.27: Nachweis des T-Polymorphismus des y-chromosomalen SNPs RBF5. In dieser untersuchten Probe wurde der am häufigsten vorkommende T-Polymorphismus des y-chromosomalen SNPs RBF 5 detektiert. Nachwiesen wurde das zum Polymorphismus komplementären Nukleotid Adenosin

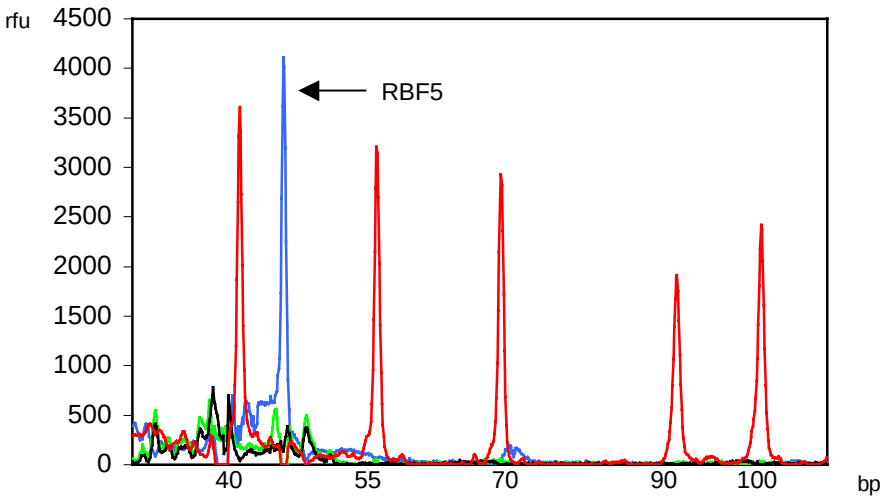


Abbildung 4.28: Nachweis des C-Polymorphismus des y-chromosomalen SNPs RBF5. In dieser untersuchten Probe wurde der C-Polymorphismus des y-chromosomalen SNPs RBF 5 detektiert. Nachwiesen wurde das zum Polymorphismus komplementären Nukleotid Guanin

5. Diskussion

Genetische Variation ist die Grundvoraussetzung für Mannigfaltigkeit allen Lebens. Sie macht jeden Menschen zu einem einzigartigen Individuum, wodurch die DNA-Analytik zu einem unverzichtbaren Werkzeug im Bereich der Rechtsmedizin geworden ist. Hierbei haben sich bisherige Analysen des menschlichen Genoms vor allem auf die Untersuchung von repetitiven Sequenzen (STRs) gestützt. Seit einigen Jahren wird jedoch der im menschlichen Genom am häufigsten vorkommende Mutationsart, den Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), mehr Beachtung zuteil. Da sich die Anzahl an bereits identifizierten SNPs ständig erhöht, wird nach immer neuen Wegen gesucht, mit denen sie sich sensitiv und zugleich ökonomisch nachweisen lassen.

Auch die Bestrebungen der hier vorliegenden Arbeit waren es, einige der für den Bereich der forensischen Analytik bedeutsamen SNPs mit Hilfe eines relativ neuen Kits zu untersuchen. Dieses Kit ermöglicht den Nachweis von SNPs durch sogenanntes Minisequencing, wobei die Ergebnisse durch die Kapillarelektrophorese sichtbar gemacht werden können (Makridakis et al. 2001, Norton et al. 2002, Turner et al.2002, Brandstetter et al.2003, Bender et al. 2003a, Bender et al. 2003b).

5.1. Das Prinzip des Minisequencing zum Nachweis von SNPs

In den vergangenen Jahren sind bereits zahlreiche Bemühungen unternommen worden, um optimale Nachweisverfahren für die SNP-Analytik zu entwickeln. Dabei können die Hybridisierung (Wang et al. 1998), die RFLP-Analytik (Kan et al. 1978), sowie das Minisequencing (Syvänen et al. 1999) als Beispiele angeführt werden. Jede dieser Methoden verarbeitet anschließend die detektierten Ergebnisse auf eine andere Weise, wie z.B. die Massenspektrometrie (Braun et al. 1997) oder unterschiedliche Formen der Elektrophorese. Dabei entspricht jedes dieser Verfahren in verschiedenem Ausmaß den Ansprüchen der forensischen Analytik. Die Entscheidung, den Nachweis von SNPs durch Minisequencing durchzuführen, hatte mehrere Gründe. Zum einen ermöglicht die Verwendung der DNA-Polymerase ein hohes Maß an Genauigkeit und Spezifität, was im Rahmen vergangener Untersuchungen bestätigt werden konnte (Pastinen et al. 1996, Pastinen et al. 1997, Syvänen et al. 1999, Cai et al. 2000). Zum anderen können gezielt

einzelne Nukleotide nachgewiesen werden, ohne eine Sequenzierung großer Bereiche des Genoms vornehmen zu müssen, wodurch ein höherer Durchsatz von Proben ermöglicht wird. Da die meisten SNPs unter ähnlichen Reaktionsbedingungen untersucht werden können, eignet sich das Minisequencing überdies zur simultanen Analyse mehrerer Positionen der DNA in einem Ansatz (Multiplex), was wiederum die Effizienz der Analyse erhöht. Das Anfang 2000 auf den Markt gebrachte SNaPshot ddNTP Primer Extention Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) basiert auf dem Reaktionsprinzip des Minisequencing und war daher zur Untersuchung von SNPs in dieser Arbeit die Methode der Wahl. Die Visualisierung der SNP-Detektion erfolgt mit Hilfe der automatisierten Kapillarelektrophorese, welche in unserem Labor seit langem etabliert ist. Daher stellte dies die geringsten Ansprüche bezüglich apparativem Aufwand, sowie Möglichkeiten der Umsetzung dar. Überdies weist die Kapillarelektrophorese Vorteile wie eine hohe Genauigkeit und geringen Zeitbedarf auf. Andere Methoden, die ebenfalls auf den Grundlagen des Minisequencing beruhen, wie z.B. das Pyrosequencing (Nordstrom et al. 2000) hätten den Kauf spezieller Geräte vorausgesetzt, weswegen sie für diese Arbeit von vornherein ausschieden. Somit schien das SNaPshot-Kit eine Methode für den SNP-Nachweis zu sein, welche einfach anzuwenden wäre. Diese Methode galt es in den Experimenten zu dieser Arbeit zu etablieren und hinsichtlich der Anwendbarkeit bezüglich forensischer Spuren zu beurteilen.

5.2. Mitochondriale DNA

Der erste Schritt bei der Untersuchung forensisch relevanter SNPs mit Hilfe des SNaPshot-Kits sollte im Bereich der mitochondrialen DNA liegen, wobei sich der Versuchsaufbau hinsichtlich Auswahl der Primer sowie Oligonukleotide an einer Arbeit von Morley et al. (1999) orientierte, die ähnlich auch von Tully et al. (1996) beschrieben wird. Morley et al. hatten mitochondriale SNPs der hypervariablen Regionen I und II auf den Grundlagen des Minisequencing untersucht und die Anwendbarkeit der Methode hinsichtlich forensischer Spuren untersucht. Dabei wählten sie einen Versuchsaufbau, der dem des SNaPshot Kits sehr ähnlich ist. Anstatt eines käuflichen Kits fertigten Morley et al. die Lösungen für das Minisequencing (fluoreszierende ddNTPs, Puffer etc.) jedoch selbst an. Das SNaPshot-Kit bietet dem Aufbau von Morley et al. gegenüber den Vorteil, dass man sich vor allem Zeit

spart, was den Probendurchsatz und möglicherweise auch die Kosten senkt. Des weiteren hat das SNaPshot-Kit im Vergleich zu Morleys Versuchsaufbau den Vorteil, dass man das PCR-Produkt relativ einfach aufreinigen kann. Von Morley et al. wurden zur Amplifizierung eines DNA-Fragmentes biotinylierte Primer verwendet, um die Lösung im Anschluss an die PCR von überschüssigen Nukleotiden reinigen zu können. Diese Methode hat den Vorzug, dass sie im hohen Maße spezifisch ist, so dass man ein sehr reines DNA-Template erhält, ohne einen großen Verlust an PCR-Produkt in Kauf nehmen zu müssen. Jedoch handelt es sich auch um ein relativ teures Verfahren zur Aufreinigung von DNA, da sowohl die Biotinylierung der Primer, als auch die Aufreinigung mit Streptavidin recht kostspielig und zeitintensiv sind. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich unmarkierte und nicht-biotinylierte Primer sowie Oligonukleotide verwendet, wobei die Lösung im Anschluss an die PCR mit einem zeit- und kostengünstigeren Aufreinigungs-Kit (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen GmbH, Hilden) von überschüssigen Primern, sowie nicht inkorporierten ddNTPs gereinigt wurde. Hierdurch lässt sich das DNA-Template zwar nicht mit derselben Qualität reinigen, wie dies mit Streptavidin möglich ist und man muss mit einem etwas höheren Verlust an PCR-Produkt rechnen. Dennoch erwies sich das SNaPshot-Kit als robust genug, um auch mit kleinen Mengen an störenden, überbleibenden PCR-Reagenzien eine klare Analyse zuzulassen.

Eine Veröffentlichung von Makridakis et al. (2001) zeigt noch eine weitere Möglichkeit auf, durch welche das PCR-Produkt vor der Durchführung einer Minisequencing Reaktion gereinigt werden kann. Makridakis et al. wendeten das SNaPshot Kit an, um SNPs autosomaler Chromosome nachzuweisen. Dabei wurden unter anderem die Resultate zweier unterschiedlicher Aufreinigungen des PCR-Produktes miteinander verglichen. Zum einen wurde das DNA-Template wie im Protokoll des SNaPshot Kits vorgeschlagen, durch QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden) aufgereinigt, zum anderen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die Menge an unspezifischen Peaks in den Aufzeichnungen der Kapillarelektrophorese deutlich vermindern lässt, wenn die Aufreinigung durch das Agarosegel erfolgt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit der Agarosegel Aufreinigung nicht versucht. Dennoch könnte dies zu einem deutlicheren Ergebnis insbesondere bei Multiplexen führen, worauf jedoch erst später eingegangen werden soll.

Mit dem in der vorliegenden Arbeit gewählten Versuchsaufbau konnte sehr schnell ein Erfolg erzielt werden, wobei jedoch zunächst auffiel, dass die Peaks nicht in jedem Fall eindeutig einer Farbe zugeordnet werden konnten. Insbesondere bei einem Peak, bei dem die zu erwartende Farbe grün (Nachweis der Base Adenin) war, erschien ein grün-schwarzer Ausschlag, wohingegen der Nachweis der Base Cytosin in einem rot-schwarzen Peak resultierte. Der Grund hierfür wäre am wahrscheinlichsten in dem verwendeten Filterset zu suchen. Es soll an dieser Stelle nochmals erwähnt werden, dass in dieser Arbeit zur Analyse der Ergebnisse durch die Kapillarelektrophorese das Filterset D verwendet wurde, obwohl der Hersteller laut Protokoll die Verwendung das Filterset E empfiehlt. Dieses wurde nicht angewandt, da sich das Einrichten der Matrix E aus nicht geklärter Ursache als problematisch erwies. Bezüglich der Auswertbarkeit der Ergebnisse blieb das Filterset E, trotz mehrfacher Neuinstallation, dem Filterset D unterlegen. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache war die Identifikation des jeweiligen Nukleotids eines SNPs dennoch problemlos möglich.

Weiterhin war zu bemerken, dass manche Oligonukleotide in den Auswertungen der Kapillarelektrophorese länger oder kürzer erschienen, als sie es in Wirklichkeit waren. Diese Längendifferenz bewegte sich in einem Rahmen von ca. 5 $\pm$2 bp und mehr, wobei gleiche Oligonukleotide jedoch in allen Auswertungen um das gleiche Maß zu lang bzw. zu kurz erschienen. Eine Erklärung hierfür konnte jedoch nicht gefunden werden. Die Interpretation der Ergebnisse wurde davon nicht beeinträchtigt.

Beim mitochondrialen SNP 73 konnte das sehr regelmäßige Auftreten eines zweiten, unspezifischen Peaks an etwa der Position 43 in den Auswertungen der Kapillarelektrophorese beobachtet werden. Innerhalb einer Versuchsreihe mit einer identischen DNA-Probe hatte dieser falsch positive Peak immer die gleiche Farbe. Ursächlich hierfür könnte eine mangelhafte Aufreinigung der verwendeten Oligos diskutiert werden. Bei der Herstellung von Primern werden diese durch verschiedene Techniken gereinigt, um fehlerhafte, z.B. zu kurze Primer, zu beseitigen. Erfolgt diese Aufreinigung nicht in ausreichendem Maße, so können die in der Primer-Lösung enthaltenen fehlerhaften Primer zu einem weiteren, falschen Peak führen. Es hätte daher durchaus sein können, dass ein zu kurzer Oligo in der Lösung mit enthalten ist, welcher dennoch spezifisch bindet und ebenso die Position 73 detektiert. Das Nukleotid des SNPs 73 schien jedoch nicht bestimmt zu werden, da die nachgewiesenen Nukleotide vom

tatsächlichen SNP 73 und falschem Peak nicht immer übereinstimmten. Eine weitere Erklärung für einen falsch positiven Peak könnte auch in der Bildung von Sekundärstrukturen gefunden werden. Um diese Vermutung zu verifizieren, wurden der Oligonukleotid H00074 durch das Computerprogramm PrimerSelect (DNASTAR, Madison, USA) untersucht. In einigen Fällen konnten relevante Ausbildungen von Sekundärstrukturen gefunden werden. Neben diesem Oligo betraf die Bildung von Sekundärstrukturen laut PrimerSelect auch die Oligos H00153 und H00248, bei denen allerdings keine falsch positiven Peaks beobachtet wurden. Wäre die Ausbildung von Sekundärstrukturen maßgeblich für diese falsch positiven Peaks verantwortlich gewesen, so hätte man ähnliche Beobachtungen jedoch auch bei Morley et al. (1999), sowie Tully et al. (1996) erwarten sollen, da von ihnen sowohl ein ähnlicher Versuchsablauf, sowie identische Oligosequenzen angewandt wurden.

Nach erfolgreicher Durchführung von Singleplex Analysen, gelang es überdies einen Multiplex mit sechs mitochondrialen SNPs anzufertigen. Dieses Ergebnis kann als besonders positiv bewertet werden, da dies mit dem SNaPshot-Kit der ersten Generation nicht in dieser Qualität zu erwarten gewesen wäre. Laut Herstellerinformationen war das SNaPshot ddNTP Primer Extention Kit in erster Linie für den Nachweis einzelner Nukleotide und nicht für einen Multiplex konzipiert worden. Erst das nachfolgende Multiplex Kit wurde für diese Ansprüche entwickelt. Ca. 80% der im Ergebnisteil aufgezeigten Resultate wurden mit dem SNaPshot-Kit der ersten Generation durchgeführt und ließen sich gut interpretieren. Es konnte allerdings beobachtet werden, dass unspezifische Signale in den Auswertungen der Kapillarelektrophorese häufiger auftraten, je mehr Oligonukleotide der Reaktion hinzugefügt wurden. In einer Veröffentlichung von Brandstätter et al. (2003) wird von ähnlichen Beobachtungen berichtet. Eine Erklärung für dieses Phänomen konnte jedoch nicht gefunden werden. Brandstätter et al. halten ebenso Sekundärstrukturen wie Hairpins und Dimere der Oligonukleotide für relevant.

Weiterhin ursächlich könnte auch ein mangelhaftes Puffer- oder Salzmilieu des Multiplex sein. Beim Einzelnachweis der SNPs wurde für den jeweiligen Oligo dasjenige Reaktionsmilieu ausgetestet, welches für ihn im Singleplex optimal ist. Vermengt man jedoch unterschiedliche Oligos, so könnte sich das Reaktionsmilieu derart ändern, dass es nicht mehr so gut eingestellt ist, wie es zuvor im Singleplex war. Zwar wurde in dieser Arbeit versucht, durch Veränderung der eingesetzten Konzentrationen der Oligos ein

besseres Ergebnis zu erzielen, jedoch zeigte dies keinen Erfolg.

Wie oben bereits erwähnt könnte eine Aufreinigung durch Agarosegel-Elektrophorese vorteilhaft sein, wie es bereits von Makridakis et al. (2001) beschrieben worden war, um unspezifische Peaks zu verringern. Makridakis et al. beschrieben des weiteren, dass eine Reduktion der Menge an PCR-Primern das Auftreten unspezifischer Peaks verringern kann. Makridakis et al. verringerten die Primer-Menge bei Durchführung von Multiplexen mit dem SNaPshot Kit von 0,25µg auf 0,05µg, wodurch das sog. „Hintergrundrauschen" sogar noch weiter verringert werden konnte. In den Experimenten zu dieser Arbeit wurde dies jedoch nicht versucht.

Im direkten Vergleich von Ergebnissen des SNaPshot ddNTP Primer Extention Kit, sowie des SNaPshot Multiplex Kit konnten zusammenfassend nur geringe qualitativen Unterschiede festgestellt werden. Im Falle des Multiplex Systems erschienen die Peaks mit einer kaum ins Gewicht fallenden, stärkeren Intensität. Der simultane Nachweis der insgesamt sechs mitochondrialen SNPs gelang in beiden Fällen ohne weiteres. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten jedenfalls keine deutlichen Vorteile des neuen, ca. 40% teureren Multiplex Kits gegenüber dem Kit der ersten Generation festgestellt werden.

5.3. Untersuchung von Problemspuren

Bei den weiteren Experimenten mit dem SNaPshot-Kit konnte belegt werden, dass sich diese Methode mit Einschränkungen auch für die im Bereich der Spurenanalytik äußerst bedeutsamen Untersuchungen von Problemspuren eignet. Bei den Spuren, in denen die DNA durch schlechte Lagerungsbedingungen degradiert war, konnten in drei von vier Fällen mitochondriale SNPs nachgewiesen werden. Besonders die Untersuchung einer Knochenprobe erbrachte sehr gute Resultate. Es handelt sich hierbei außerdem um die einzige DNA-Probe, bei der das Phänomen der Heteroplasmie sicher beobachtet werden konnte. Nach Angaben der EMPOP (European mtDNA Population Database, www.empop.org) lässt sich dieses Phänomen am Lokus 152 mit einer relativen Häufigkeit von 0,011 unter österreichischen Kaukasiern finden. Heteroplasmie wurde auch in der Studie von Morley et al. (1999) beobachtet, allerdings beim Lokus 302/309.1. Morley et al. beschreiben dort, dass die Intensität der beiden Peaks der unterschiedlichen inkorporierten

ddNTPs abnimmt, verglichen mit einer Probe ohne Heteroplasmie. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden, obwohl bei Morley et al. die selben fluoreszierenden Farbstoffe verwendet wurden. Insgesamt kann der deutliche Nachweis der Heteroplasmie wie in diesem Fall beschrieben als sehr positiv bewertet werden. In keiner anderen DNA-Probe konnte ein so deutlicher doppelfarbiger Peak detektiert werden. Mit dem klassischen Nachweisverfahren von SNPs, der RFLP-Analyse, hätte man dieses Ergebnis nicht erhalten können, da sich durch diese Methode nur dasjenige Nukleotid sicher nachweisen lässt, bei dem das DNA-Template durch das Enzym geschnitten wird. Bei allen drei anderen möglichen Nukleotiden wäre das Ergebnis das gleiche, nämlich dass die DNA nicht zerteilt wird. Welches Nukleotid in diesem Fall jedoch vorliegt, oder ob unter Umständen im gleichen Individuum Heteroplasmien vorliegen, kann nicht sicher beurteilt werden. Daher kann das SNaPshot-Kit durch die umfassende Detektion aller, an ein und dem selben Lokus denkbaren Nukleotide, als sehr positiv bewertet werden.

Die Tatsache, dass nicht jeder SNP bei den Problemspuren nachweisbar war bzw. dass in einigen Fällen fehlerhafte Ergebnisse resultierten, könnte unter anderem durch die Durchführung einer Re-PCR erklärbar sein. Die Re-PCR könnte zu einer fehlerhaften Amplifikation einiger DNA-Abschnitte geführt haben, so dass das 3'-Ende einiger Oligonukleotide nicht mehr spezifisch binden konnte. Eine weitere mögliche Erklärung könnte sein, dass das Verhältnis der Konzentrationen von Oligonukleotid und DNA-Template nicht optimal übereinstimmte. Nach der Durchführung der Re-PCR stellten sich die Bande im Silbergel nicht mit der selben Intensität dar, wie dies bei den zuvor untersuchten Proben der Fall gewesen war. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass der DNA-Gehalt der Probe geringer war, weswegen das für die PCR eingesetzte Teilvolumen an DNA-Template vergrößert wurde. Dies könnte zu einem ungünstigen Reaktionsmilieu für einige Oligonukleotide geführt haben. In Studien anderer Arbeitsgruppen, welche ebenfalls mit den SNaPshot-Kit experimentierten (Makridakis et al. 2001, Norton et al. 2002, Turner et al.2002, Brandstetter et al.2003, Bender et al. 2003a, Bender et al. 2003b) wurde der im SNaPshot eingesetzte DNA-Gehalt genau bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde auf diesen zusätzlichen Arbeitsschritt verzichtet. Der DNA-Gehalt des PCR-Produktes wurde über die Intensität der Banden im Silbergel gegen einen Standard abgeschätzt. Trotz dieser vereinfachten Vorgehensweise konnten Ergebnisse ähnlich denen der oben erwähnten Arbeitsgruppen erzielt werden.

Selbstverständlich muss auch in Betracht gezogen werden, dass in einigen der untersuchten Spuren, die DNA bereits soweit degradiert war, dass die jeweils zu amplifizierenden Abschnitte der DNA nicht mehr intakt waren.

Die Tatsache, dass sich ein SNP-Nachweis mit dem SNaPshot-Kit bei der Knochenprobe einfacher durchführen ließ als bei den übrigen Problemspuren, deckt sich weitestgehend mit den Beobachtungen anderer Forschungsgruppen (Gill et al. 1994, Boles et al. 1995, Pfeiffer et al. 1998). Aufgrund von Untersuchungen an Jahrzehnte alten Skelettfunden ist bekannt, dass insbesondere in Knochen (Gill et al. 1994), sowie dem Dentin der Zähne (Boles et al. 1995, Pfeiffer et al. 1998) sowohl Kern-DNA, als auch mitochondriale DNA sehr lange unversehrt erhalten bleibt. Gill et al. (1994) untersuchten beispielsweise STRs der DNA von Zellkernen und Mitochondrien in über 70 Jahre alten Skelettfunden. Die Ergebnisse dieser Forschungsgruppe führten schließlich zur Identifizierung einiger Mitglieder der russischen Zarenfamilie Romanov.

Insgesamt kann das Kit hinsichtlich der Anwendbarkeit bei degradierten Spuren als zufriedenstellend eingestuft werden. Da für das Minisequencing nur relativ kurze DNA-Fragmente amplifiziert werden müssen, ist dies meistens auch dann noch möglich, wenn die DNA an manchen Stellen beispielsweise durch Fäulnis degradiert ist. Die in dieser Arbeit amplifizierten PCR-Fragmente der mtDNA hatten eine Länge von 302-326bp, so dass in vielen Fällen dieses Fragment durchaus noch intakt sein könnte. Zwar waren auch in den hier untersuchten Spurenfällen nicht alle SNPs nachweisbar. Dennoch könnten in der Zukunft bei Auswahl eines ausreichend großen Sets an SNPs, durch das SNaPshot-Kit zumindest weiterführende Hinweise zur Eingrenzung putativer Spurenverursacher ermöglicht werden.

5.4. Y-chromosomale SNPs

Verglichen mit mitochondrialer DNA, bei welcher die Detektion von SNPs verhältnismäßig einfach gelang, erforderte die Untersuchung der Y-chromosomalen SNPs eine präzisere Bestimmung der Konzentrationsbereiche der Oligonukleotide.

Gemäß den Erwartungen wurden bei den untersuchten SNPs die Allele gefunden, welche laut Literatur am häufigsten vorkommen (Hurles et al. 1999, Zerjal et al. 1997). Bei den

SNPs SRY-1532, M9, RBF5 und M89 konnten darüber hinaus die ebenso in der Literatur beschriebenen Polymorphismen beobachtet werden, die sich hinsichtlich der zu erwarteten Häufigkeit in etwa mit den Quellen deckte. Beim SNP TSC0317027, bei dem in allen untersuchten Proben das Nukleotid Adenin detektiert wurde, deckten sich die Angaben jedoch nicht mit denen des SNP-Consortiums bzw. mit Ergebnissen der Sequenzierung. Die Sequenz des hierfür benötigten Oligonukleotids schien laut Primer-Testprogramm gut anwendbar zu sein. Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür dürfte dennoch in einer Unspezifität des verwendeten Oligonukleotids zu finden sein. In jeder untersuchten Proben wurde neben dem eigentlichen Peak noch weitere kleinere Peaks im Abstand von ca. 5-10bp aufgezeichnet, welche eben auf eine solche Unspezifität hinweisen könnten.

Dieses Beispiel verdeutlicht einen problematischen Punkt bei der Anwendung des SNaPshot-Kits, nämlich das Design von Oligonukleotiden. Zur Detektion eines SNPs muss der jeweilige Oligonukleotid mit seinem 3'-Ende genau eine Base vor der Punktmutation liegen, was die Möglichkeiten des Primerdesigns stark einschränkt. Das Auftreten stabiler Hairpins, sowie Dimer-Formationen lässt sich oftmals nicht vermeiden. Aus diesem Grund scheidet bereits von vornherein bei etlichen SNPs die Möglichkeit der Analyse mittels SNaPshot-Kit aus. Den oben genannten Schwierigkeiten kann jedoch teilweise durch geeignete Modifizierung der Primersequenz entgegnet werden. Generell kann der Primer sowohl auf dem Vorwärts (sense)- als auch auf dem Rückwärts (antisense)- Strang gewählt werden, je nachdem welche Sequenz für das Primerdesign unproblematischer erscheint. Da die Sequenz am 3'-Ende des Primers beim Minisequencing durch die DNA-Matritze vorgegeben ist, kann außerdem in manchen Fällen die Substitution eines oder mehrerer Nukleotide am 5'-Ende das Problem von Dimer- oder Hairpinbildung mindern. Empfehlungen, welche auch für das Design von Primern für die PCR bestehen, haben auch für das Oligodesign bei Anwendung des SNaPshot-Kits Gültigkeit.

Des weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch ein Multiplex mit SNPs von drei unterschiedlichen PCR Regionen zuverlässig durchzuführen ist. Den Erkenntnissen von Sachidanandam et al. (2001) nach zu urteilen kommen SNPs im menschlichen Genom durchschnittlich alle 1,9kb vor, was demzufolge die Amplifikation mehrerer DNA-Fragmente verlangt, sofern ein Multiplex angefertigt werden soll. Dies bereitet jedoch in manchen Fällen Schwierigkeiten, da die verwendeten Primer in Hinblick auf Reaktionsbedingungen häufig unterschiedliche Anforderungen stellen. Hinzu kann eine

fehlerhafte Bindung der Primer untereinander (Dimere) auftreten. Die Durchführung einer Multiplex-PCR mit anschließendem Multiplex-SNaPshot erniedrigt andererseits den Arbeitsaufwand. Einige Arbeitsgruppen, welche autosomale SNPs mit dem SNaPshot-Kit untersuchten (Turner et al. 2002, Norton et al. 2002) fertigten für jeden SNP ein eigenes PCR-Produkt an. Für einen Multiplex-SNaPshot mischten sie dann jeweils gleiche Volumina an PCR-Produkt zu einer Lösung zusammen. Turner et al. (2002) konnten auf dieser Weise einen 9-plex autosomaler SNPs nachweisen, was durchaus als beachtlich angesehen werden kann. Norton et al. (2002) hingegen hatte die besten Resultate mit einem Quadruplex. Ein Nachteil des Mischens von PCR-Produkten besteht darin, dass sich die Intensität der durch die Kapillarelektrophorese aufgezeichneten Peaks im Multiplex verringert. Diese Beobachtung wird von Norton et al. (2002) beschrieben und durch die geringere Menge an PCR-Template in der Mischung erklärt.

Der Nachweis eines Y-chromosomalen Quadruplex wie bei Norton et al. (2002) gelang mit dem in dieser Arbeit gewählten Vorgehen nicht, was analog einem Multiplex der mt-DNA am wahrscheinlichsten durch Interaktionen der Primer untereinander zu erklären ist. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Lareu et al. (2001) mit dem Lightcycler gemacht. Zwar gelang es ihnen noch einen Quadruplex mit Y-chromosomalen SNPs herzustellen. Doch alles darüber hinaus bereitete ihnen ebenso Schwierigkeiten, wobei auch Lareu et al. (2001) das Phänomen des Mispriming maßgeblich dafür verantwortlich halten. Andere Arbeitsgruppen die das SNaPshot Kit verwendeten, kamen zu ähnlichen Ergebnissen wie hier beschrieben. Bender et al. (2003a) und Bender et al. (2003b) konnten bei der Untersuchung von Y-SNPs mit vorausgehender Multiplex-PCR Duplexe und Triplexe herstellen. Dabei wurden bei der Durchführung des SNaPshots teilweise die gleichen SNPs untersucht wie in der vorliegenden Arbeit, sowie die selben Oligosequenzen verwendet, jedoch teilweise unterschiedliche Primer. Der Frage, ob eine Mischung von PCR-Produkten wie bei Turner et al. (2002) und Norton et al. (2002) zu einen umfangreicheren Multiplex als in dieser Arbeit beschrieben, geführt hätte, wurde nicht nachgegangen.

Shapero et al. (2001) zeigten eine Möglichkeit auf, wie dem Problem der Bildung von Sekundärstrukturen entgegnet werden könnte. Shapero gelang es, Primer mit ihrem 5‘-Ende an Acrylamid-Kügelchen zu binden, so dass die Vermehrung von doppelsträngiger DNA unmittelbar an diesem Kügelchen stattfindet. Hierdurch wird die Wahrscheinlichkeit

von unspezifischen Kreuzreaktionen der Primer bzw. PCR-Produkte untereinander verringert. Am Ende der PCR kann die Lösung von überschüssigen Nukleotiden gereinigt werden, bevor die doppelsträngige, an Acrylamid-Kügelchen gebundene DNA schließlich enzymatisch abgespalten wird. Sie gelangt somit in Lösung, um weiteren Reaktionen wie dem Minisequencing oder auch der Hybridisierung zur Verfügung zu stehen. Mit dieser Methode erreichte Shapero (2001) den simultanen Nachweis von insgesamt 57 Loki der DNA durch Minisequencing in einem Reaktionsansatz.

5.5. Männlich-weibliche Mischspuren

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werde, dass sich das Kit für die Untersuchung forensisch relevanter männlich-weiblicher Mischspuren eignet. Bei künstlich hergestellten Mischspuren gelang der Nachweis des Y-chromosomalen SNPs RBF5 bis zu einem Verhältnis von 1:200 (männlich : weiblich). Bei der Mehrzahl der SNPs lag die Nachweisgrenze jedoch bei ca. 1:50. Verglichen mit den Resultaten, die mit anderen Verfahren für den SNP-Nachweis erhalten wurden (z.B. Lightcycler: Lareu et al. 2000), kann dieses Ergebnis als sehr zufriedenstellend beurteilt werden. Lareu et al. (2000) gelang mit Hilfe des Lightcyclers bei den von ihnen untersuchten SNPs ein zuverlässiger Nachweis bis zu einem Verhältnis von 1:100 (männlich : weiblich). Die Sensitivität der einzelnen Oligonukleotide wies bei Lareu et al. jedoch eine andere Verteilung auf als dies bei unseren Untersuchungen der Fall war. Dies könnte möglicherweise durch die andere Sequenz der verwendeten Oligonukleotide in seinen Untersuchungen begründet sein.

Bei den Analysen realer männlich-weiblicher Mischspuren eines Spurenfalles unterschied sich die Sensitivität der einzelnen Y-SNPs jedoch von den im Labor erzeugten Mischspuren. Der SNP M9 beispielsweise, der im Experiment nur bis zu einem Verhältnis von 1:10 eindeutig nachzuweisen war, ließ sich auch dann nachweisen, wenn der SNP RBF5 kein Ergebnis erbrachte. Möglicherweise kann dies durch die Variabilität des DNA-Gehaltes unterschiedlicher Proben erklärt werden.

Die gewählten Oligosequenzen können für das Arbeiten mit dem SNaPshot-Kit als sehr spezifisch angesehen werden, da in keiner rein weiblichen DNA-Probe ein falsch positiver Nukleotidnachweis erfolgte.

5.6. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs)

Neben der Sequenzierung wurde in dieser Arbeit auch exemplarisch die RFLP-Analyse eingesetzt, um die Ergebnisse des SNaPshot-Kits zu verifizieren und diese beiden Methoden miteinander zu vergleichen. Dabei konnten in allen untersuchten Proben Übereinstimmungen der Resultate von Kit und RFLP-Analytik gefunden werden.

Untersucht man in einer großen Zahl von Proben einen einzelnen SNP, so hat die RFLP-Analytik einen deutlichen Vorteil gegenüber dem Kit, da die Kapillarelektrophorese viel Zeit beansprucht, um alle Proben zu analysieren. Jedoch ermöglicht das Kit das Anfertigen von Multiplexen, was durch RFLP nur schwer zu bewerkstelligen ist. Somit lassen sich mit dem Kit nicht nur Kosten, sondern auch Zeit bei der SNP-Analytik einsparen. Des weiteren ist die Anzahl der SNPs, welche sich aufgrund der DNA-Sequenz für einen Restriktionsverdau eignen, wesentlich geringer, als für eine Minisequencing Reaktion. Weiterhin ist zu bemerken, dass sich SNPs auch weiterentwickeln können, so dass mehr als zwei unterschiedliche Nukleotide an einem Lokus vorkommen können. Mit dem Kit wäre in solch einem Fall eine genaue Bestimmung des vorliegenden SNPs möglich, während dies mit RFLP-Analytik nicht zu bewerkstelligen ist.

5.7. Allgemeines zum SNaPshot-Kit

5.7.1. Verunreinigungen

Um eine DNA-Probe hinsichtlich SNPs zu untersuchen sind unter Verwendung des SNaPshot-Kits eine Reihe von Handgriffen zu tätigen. Dies bedeutet konkret, dass der Reaktionsbehälter der Probe für einen SNaPshot-Durchlauf dreimal geöffnet werden muss und diverse Reagenzien hinzugefügt werden müssen, bis man schließlich ein Ergebnis in den Händen hält. Dies birgt ein nicht zu vernachlässigendes Kontaminationsrisiko in sich, da die Analyseergebnisse durch Verunreinigungen beeinflusst oder sogar verfälscht werden können. Hierbei handelt es sich um einen Nachteil des SNaPshot-Kits, der nur durch konsequente Einhaltung der in DNA-Labors üblichen Regeln bezüglich Qualitätssicherung eingedämmt werden kann.

5.7.2. Qualitätskriterien

Um sich für die Routineanalytik in einem Labor etablieren zu können, muss ein Verfahren die allgemeinen Qualitätskriterien bezüglich Reproduzierbarkeit, Sensitivität und Validität erfüllen. Dass mit Hilfe des SNaPshot-Kits ein sehr sensitiver Nachweis von SNPs möglich ist, wurde bereits in Kapitel 5.6 diskutiert. Hinsichtlich der Reproduzierbarkeit ist jedoch folgendes zu bemerken. Während die Ergebnisse bei der Verwendung eines Kits durchaus reproduzierbar waren, so zeigten sich beim Vergleich unterschiedlicher Kits zum Teil erhebliche Unterschiede. In einem Fall lieferten Proben, mit denen zuvor ein SNaPshot problemlos durchzuführen war, bei der erneuten Untersuchung mit einem anderen Kit keinerlei verwertbare Ergebnisse mehr. Weitere, im Kit nicht enthaltene Reagenzien (CIP, Aqua bidest., usw.) konnten hierbei als Fehlerquelle eindeutig ausgeschlossen werden, da sie sich bei Analysen mittels anderer Verfahren als einwandfrei erwiesen, bzw. erneuert worden waren. Die Qualität des Kits scheint daher noch nicht vollständig ausgereift zu sein. Mängel der Reagenzien des SNaPshot-Kits sollten daher vor Verwendung jedes neuen Kits anhand der im Kit beigefügten Kontrollreaktion unbedingt ausgeschlossen werden.

Weiterhin war in seltenen Fällen zu beobachten, dass Nukleotide nachgewiesen wurden, welche nicht mit den Erkenntnissen bereits publizierter Studien in Einklang zu bringen waren. Hierzu folgendes Beispiel:

An der Position 152 der HVR II der mitochondrialen DNA lässt sich ein T $\rightarrow$ C Polymorphismus finden. Der von uns verwendeten Oligonukleotid konnten folglich durch die zur DNA-Matrize komplementären Nukleotide A bzw. G verlängert werden, was in den Auswertungen der Kapillarelektrophorese in einem grünen bzw. einem blauen Peak hätte resultieren müssen. Beides wurde im Verlauf der Studie beobachtet und sogar das Phänomen der Heteroplasmie konnte zuverlässig detektiert werden. Jedoch wurden in Einzelfällen auch rote Peaks detektiert, was bedeutet hätte, dass das Nukleotid Adenin an dieser Position hätte vorliegen müssen. Die Abbildung 5.1 zeigt dieses Resultat auf. Ein solcher Polymorphismus ist jedoch nicht bekannt und auch die Sequenzierung konnte das durch das Kit gefundene Ergebnis nicht bestätigen.

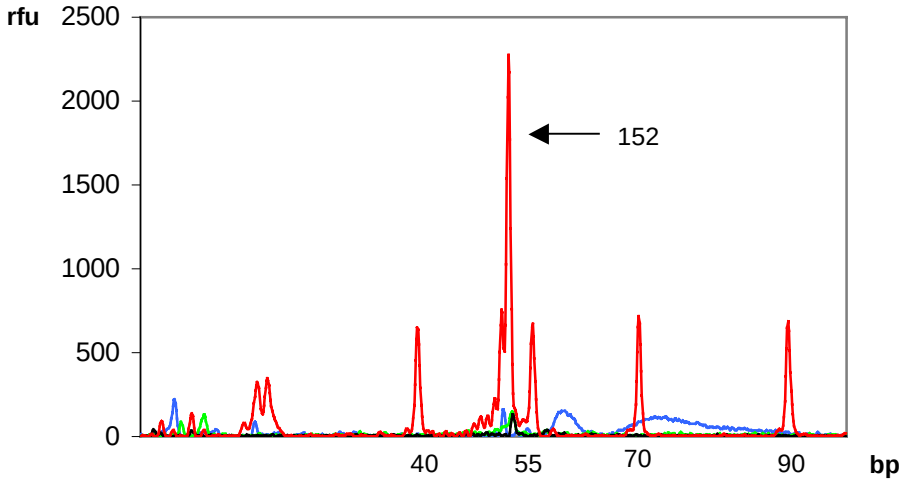


Abbildung 5.1: Fehlerhafte Detektion des Nukleotid Thymin an der Position 152 der HVR II der mitochondrialen DNA. An diesem Lokus findet sich ein T/C Polymorphismus. Demnach hätten die zum Polymorphismus komplementären Base Adenin (grün) oder G (blau) detektiert werden müssen. Ein A-Polymorphismus ist jedoch nicht bekannt und konnte auch nicht durch die Sequenzierung bestätigt werden.

Eine mögliche Erklärung könnte die Unspezifität des Oligonukleotids sein. Da dieser jedoch in fast allen untersuchten Proben sehr zuverlässig funktionierte und da die stichprobenhaften Ergebnisse von SNaPshot-Kit und Sequenzierung übereinstimmten, ist dies nicht allzu wahrscheinlich. Eine weitere mögliche Ursache war in unzureichender Aufreinigung des PCR-Produktes gesucht worden. Doch auch dies wurde nicht als wahrscheinlich angesehen, da sich falsch positive Peaks sowohl unter Durchführung der Aufreinigung, als auch ohne feststellen ließen. Durch den Reinigungsschritt sollen vor allem nicht-inkorporierte ddNTPs entfernt werden. Diese könnten ansonsten anstelle des fluoreszenzmarkierten ddNTPs des SNaPshot-Kits eingebaut werden. Nach dem Einbau des falschen Nukleotids reißt die Kette dann jedoch nicht ab, so wie es nach Einbau des floureszierenden Nukleotids des SNaPshot-Kits der Fall ist. Der Oligonukleotid kann daher in einer weiteren Reaktion nochmals - dann mitunter durch das eigentliche „fluoreszierenden SNaPshot-Nukleotid“ - verlängert werden, wobei dann allerdings nicht der SNP selbst nachgewiesen wird, sondern die Position strangaufwärts davon. Es wurde jedoch festgestellt, dass die Notwendigkeit der PCR-Reinigung bei Untersuchungen der mtDNA nicht so sehr ins Gewicht fiel, wie dies beim Y-Chromosom der Fall war. Im direkten Vergleich von Ergebnissen der mtDNA mit und ohne Aufreinigung konnten keine grundlegenden Unterschiede festgestellt werden. Peaks an falscher Position bzw. Peaks mit

inkorrektem Nukleotidnachweis konnten sowohl nach Aufreinigung des PCR-Produkt als auch ohne Aufreinigung gefunden werden. Allerdings war die Aufreinigung des PCR-Produktes bei Analysen von Y-SNPs sehr wohl von Bedeutung, da das Auftreten unspezifischer Signale hier gemindert werden konnte. Es ist denkbar, dass durch die größere Menge an PCR-Produkt der mtDNA der Anteil an unspezifischen Verbindungen verhältnismäßig gering blieb und somit die Auswertungen nicht störte. Eine weitere mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass aufgrund der größeren DNA-Menge der mt-DNA in der Probe die PCR-Reagenzien weitestgehend aufgebraucht waren, und somit die nachfolgende SNaPshot Reaktion nicht weiter störten. Generell kann die Aufreinigung des PCR-Produktes vor der Analyse durch das SNaPshot-Kit empfohlen werden.

Durch genanntes Beispiel wird deutlich, wie anfällig die Methode des Minisequencing und somit auch des SNaPshot-Kits, gegenüber falsch-positiven Ergebnissen ist. Selbst wenn sich nur bei einem geringen Anteil der Oligonukleotide Haarnadeln oder Dimere bilden bzw. wenn verschiedene Oligos untereinander Verbindungen eingehen, kann das durch die Kapillarelektrophorese erhaltene Ergebnis falsch positiv werden. Bildung von Sekundärstrukturen wurden jedoch im Falle des SNPs 152 nicht angenommen, da die Reaktionsbedingungen nicht verändert wurden und somit ein sporadisches verändertes Reaktionsverhalten des Oligonukleotids nicht allzu wahrscheinlich erscheint.

5.8. Die Zukunft der SNP-Analytik

Das Ziel der SNP-Analytik für forensische Fragestellungen wird es sein, ein Set von SNPs auszuwählen, welches eine eindeutige Identifizierung eines Individuums mit einer Wahrscheinlichkeit von >99,99% erlaubt. Aufgrund der Tatsache, dass SNPs nur zwei Allele aufweisen, müssen mehr Marker als bei der Verwendung von Mikrosatelliten herangezogen werden, um die in der Forensik geforderte Wahrscheinlichkeit zu erreichen. Bei einer statistischen Frequenz der Allele von 0,5/0,5 müssen ca. 50 SNPs herangezogen werden, um eine Identifikation mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,994% zu betätigen (Gill et al. 2000). Um ein Set von 14 STRs zu ersetzen, wären nach Untersuchungen von Krawczak (1999) 60 SNPs, jeder mit einer statistischen Häufigkeit von 50%, nötig. Leider kommen die meisten der in dieser Arbeit untersuchten SNPs in Deutschland mit einer

Häufigkeit von 0,9/0,1 oder niedriger vor. Erschwerend kommt hinzu, dass bis heute noch nicht genügend Informationen über die Häufigkeiten der einzelnen Allele eines SNPs vorliegen. Für den routinemäßigen Einsatz von SNP-Analysen wird daher ein noch umfangreicheres Wissen über das Mutationsverhalten erforderlich sein. Dies gilt für Y-Chromosomale SNPs ebenso, wie für die SNPs der mitochondrialen DNA.

Die grundsätzliche Einschränkung der Nutzbarkeit von mtDNA für forensische Zwecke ergibt sich aus der eindeutigen Zuordnung einer Spur zu einer Person. Informationen aus kodierenden Bereichen des menschlichen Genoms dürfen per Gesetz nicht zur Erstellung eines genetischen Fingerabdruckes herangezogen werden, da solche Informationen zu einem missbräuchlichen Screening, beispielsweise nach Krankheitsveranlagungen eines Individuums, führen könnte (Eaden et al. 2001). Demzufolge beschränken sich bisherige forensische Untersuchungen der mtDNA in Deutschland ausschließlich auf die beiden hypervariablen Regionen HVR I und II, da dies beinahe die einzigen nicht-kodierende Bereiche des mitochondrialen Genoms sind. Da diese beiden Regionen zusammen jedoch nur eine Informationsbreite von ca. 610bp besitzen, finden sich innerhalb einer Population meist mehrere, nicht verwandte Individuen, welche in diesem Bereich die gleiche Basenabfolge aufweisen. Diese Problematik lässt sich am Beispiel der vermissten amerikanischen Soldaten des koreanischen Krieges (Boles et al. 1995) verdeutlichen. Es war versucht worden, vermisste Soldaten anhand von Skelettteilen zuzuordnen. Hierzu wurden die Regionen HVR I und II sequenziert und mit den Basenabfolgen der Angehörigen der Opfer verglichen. Da jedoch der am häufigsten vorkommende Haplotyp HVR I/HVR II in etwa 7% der amerikanischen Bevölkerung zu finden ist (Parson et al. 2001), konnten die sterblichen Überreste nicht in allen Fällen ausschließlich einer vermissten Person zugeordnet werden.

Aus diesem Grund haben es sich einige Labore zur Aufgabe gemacht, in die Analyse weiterer Regionen der mtDNA zu investieren, wobei bereits eine dritte hypervariable Region ausgemacht werden konnte (Lutz et al. 1997). Überdies soll versucht werden, sogenannte stumme bzw. neutrale Positionen des mitochondrialen Genoms genauer zu untersuchen. Hierbei handelt es sich beispielsweise um Polymorphismen im Bereich der dritten Stelle eines Codons einer kodierenden Region, welche keine Änderung der Aminosäurensequenz bewirken. Diese haben daher keinen Einfluss auf den Phänotyp eines Menschen. Somit könnte die Gefahr umgangen werden, bei der eine Person in der

forensischen Analytik bewusst oder unbewusst einem genetischen Screening unterzogen werden könnte. Gemeinsam mit SNPs aus HVR III und stummen Polymorphismen wäre es vielleicht möglich, ein ausreichend großes Set an mitochondrialen SNPs zu erhalten. Dieses könnte ausreichen, um z.B. den Kreis von verdächtigen Personen in einem Kriminalfall noch weiter einzugrenzen, als dies momentan möglich ist. Da die mitochondriale DNA die mitunter höchste Dichte an SNPs im menschlichen Genom besitzt, wären allein durch mt-Analytik mit dem SNaPshot-Kit lohnende Untersuchungen möglich. Geht man beispielsweise von einem Quadruplex aus, mit dem in dieser Arbeit bezüglich mt-DNA die besten und zuverlässigsten Ergebnisse erzielt werden konnten, so wären für eine Identifizierung nach den oben erwähnten Anforderungen etwa 16 SNaPshot Ansätze nötig. Dies mag nach einer sehr hohen, aufwendigen Menge klingen. Es gibt jedoch Fälle in denen man mit der momentan üblichen STR-Analytik zu keinem Ergebnis kommt, da beispielsweise die DNA hochgradig degradiert ist. Hier wäre die Untersuchung von mt-SNPs eine Möglichkeit, um doch noch ein Resultat zu erzielen, mit dem der Kreis an Personen eingeschränkt werden könnte. Des weiteren müssen bezüglich mtDNA genauere Daten hinsichtlich des Auftretens von Heteroplasmien erhoben werden. Es wird daher Aufgabe sein, zahlreiche weitere Studien durchzuführen, bis SNPs Einzug in die Routineanalytik der forensischen Labors haben können.

Auch im Bereich Y-chromosomaler SNPs werden noch etliche Untersuchungen von Nöten sein. Eine Möglichkeit, mit der das Set an benötigten SNPs für eine eindeutige Identifikation niedrig gehalten werden kann, könnte auch in die Richtung einer Studie von Kayser et al. (2001) führen. Kayser et al. erhoben beispielsweise umfangreiche Daten über die regionale Herkunft eines Y-Chromosoms, in der sowohl Y-STRs als auch Y-SNPs herangezogen wurden.

Im Jahre 1999 begann eine Arbeitsgemeinschaft pharmazeutischen Firmen und des Wellcome Trust damit, eine allgemein zugängliche Datenbank für SNPs zu erstellen. Ziel dieses sogenannten „SNP Consortium“ war es innerhalb weniger Jahre die damals geschätzte Anzahl von 300 000 SNPs zu identifizieren, um weiterführende Erforschung dieser Art von Mutation zu erleichtern. Bis September 2001 wurde dieses Ziel mehr als erreicht, so dass inzwischen mehr als 1.500.000 in der Datenbank aufgeführt werden, die jedoch erst nach strenger Qualitätskontrolle in Schüben veröffentlicht werden. Die bisher bestehenden Ergebnisse sollen durch Informationen beispielsweise über Allelfrequenzen

ergänzt werden, um somit eine umfangreiche Datenbank aufbauen zu können. Neben dem SNP Consortium unterhält auch das National Center for Biotechnology (NCBI) eine umfangreiche Datenbank für SNPs. Bis Anfang 2001 enthielt die Datenbank dbSNP von NCBI insgesamt 556 694 SNPs.

Um eine Größenordnung von ca. 60 SNPs zeit- und kostensparend untersuchen zu können, wird unter anderem im Bereich der Biochip Entwicklung geforscht. Die Begriffe Biochip oder Microarray bezeichnen die systematische Anordnung von biomolekularen Sonden wie Nukleinsäuren (z.B. cDNA), Antikörpern, Peptiden oder Proteinen auf einer festen Oberfläche aus Metall, Glas oder Kunststoff. Mit dieser Art von Sonden-Arrays ist es möglich, parallel arbeitende, miniaturisierte Analysesysteme auf möglichst kleiner Fläche zu erhalten, wodurch die automatisierte und schnelle Analyse von Genen und Genprodukten erreicht werden soll. Mittlerweile hat die Chip-Analytik bereits in einer ganzen Reihe von Forschungsgebieten ihre Anwendung gefunden. Dazu zählen in erster Linie die Zell- und Entwicklungsbiologie, die Pharmakologie und die Krebsforschung.

Die Mehrzahl der bisherigen Ansätze zur Erstellung von Biochips beruhen auf dem Prinzip der Hybridisierung zwischen der zu untersuchenden DNA und immobilisierten DNA-Sonden. Gerade im Bereich der Hybridisierung weisen SNPs jedoch einen deutlichen Vorteil gegenüber STRs auf, da sich aufgrund der z.T. identischen repetitiven Anordnung der Nukleotide eines STRs häufiger unspezifische Hybridisierungen beobachten lassen (Feng et al. 1999), was die eindeutige Interpretation des Ergebnisses deutlich erschweren kann.

Im Bereich der forensischen Analytik gelang es schon DNA-Extraktion, PCR-Amplifikation und Kapillarelektrophorese auf Chipebene erfolgreich durchzuführen (Kricka 1998). Schmalzing et al. beschrieb bereits 1999 die forensische Anwendung einer Multiplex-PCR, bestehend aus acht STR-Systemen in miniaturisierter Form.

Der zukünftige Trend der forensischen DNA-Analyse könnte nach derzeitigem Kenntnisstand neben der Biochiptechnologie auch in die Richtung der MALDI-TOF MS (Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) gehen. Für die Analyse von STRs (Butler et al. 1999) sowie von SNPs (Li et al. 1999) benötigt man mit diesem Verfahren nur den Bruchteil einer Sekunde, wodurch ein hoher Probendurchsatz ermöglicht werden kann. Durch die Identifizierung der Allele anhand ihres Molekulargewichtes ist die MALDI-TOF MS durch eine sehr hohe Genauigkeit

gekennzeichnet. Seit einiger Zeit wird an der Miniaturisierung dieses Systems gearbeitet und auch in den Bereich der SNP-Analytik ausgedehnt. Wie viel Zeit vergehen wird, bis miniaturisierte Systeme für Untersuchungen an SNPs in forensischen Laboren routinemäßig Anwendung finden, bleibt jedoch abzuwarten.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode für den Nachweis von SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms, Einzelnukleotid Polymorphismen, Punktmutationen) in unserem Labor zu etablieren und ihren Nutzen hinsichtlich forensischer Fragestellungen zu untersuchen. Ein seit einiger Zeit erhältliches Kit (SNaPshot-Kit, Applied Biosystems, Weiterstadt) vereint die Vorzüge von sowohl Minisequencing, als auch automatisierter Kapillarelektrophorese. Es sollte daher in dieser Arbeit maßgeblich verwendet werden.

Bei Untersuchungen forensisch relevanter SNPs der hypervariablen Regionen I und II der mitochondrialen DNA konnte gezeigt werden, dass sich mit Hilfe des Kits sowohl einzelne Punktmutationen, als auch bis zu sechs SNPs als Multiplex nachweisen lassen. Auch in Spuren, die z. T. stark degradierte DNA enthielten, ließen sich einzelne der untersuchten SNPs nachweisen.

Bei Untersuchungen des männlichen Y-Chromosoms konnten fünf der ursprünglich acht ausgewählten SNPs der geschlechtsspezifischen Region als Singleplex nachgewiesen werden. Überdies gelang es, einen Multiplex mit bis zu drei Y-SNPs durchzuführen. Weiterhin wurden künstlich hergestellte männlich-weibliche Mischspuren untersucht, bei denen Y-chromosomale SNPs bis zu einem Verhältnis von bis zu 1:200 (männlich : weibliche DNA) nachgewiesen werden konnten. Auch in echten Mischspuren aus Verbrechensdelikten gelang dieser Nachweis in einigen Fällen. Der Y-chromosomale SNP RBF5 wurde sowohl durch die Analyse eines RFLP (Restriktionslängen-Polymorphismus) als auch durch das SNaPshot-Kit untersucht worden. Hierbei stimmten in allen Fällen die Ergebnisse von RFLP-Analytik und SNaPshot-Kit überein.

Insgesamt erwies sich das Kit als eine relativ robuste Methode für den SNP-Nachweis. Hiermit lassen sich bei verhältnismäßig geringem Zeit- und Materialaufwand, einzelne Nukleotide und kleinere Multiplex-Systeme identifizieren. Zwar ist das Kit als solches durchaus für forensische Fragestellungen anwendbar. Doch angesichts der Menge von ca. 50-60 SNPs, welche man für die sichere Identifizierung von Personen benötigen würde, ist das Kit hinsichtlich Zeit- und Kostenaufwand nicht für Routineuntersuchungen geeignet. Allerdings könnte es in Einzelfällen, z.B. bei stark degradierter DNA, in Überlegung gezogen werden, wenn mit den derzeit üblichen Nachweisverfahren kein Ergebnis mehr zu erzielen ist.

7. Literatur

Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson A, Sterky F, Nyrén P, Uhlén M, Lundeberg J: Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. Anal Biochem 280: 103-110 (2000)

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG: Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. Nature 290: 457-464 (1981)

Baasner A, Schäfer C, Junge A, Madea B: Polymorphic sites in human mitochondrial DNA control region sequences: population data and maternal inheritance. Forensic Sci Int 98: 169-178 (1998)

Bender K, Stradmann-Bellinghausen B, Rittner C, Schneider PM: Comparative analysis of short tandem repeats and single nucleotide polymorphisms on the Y-chromosome in Germans, Chinese and Thais. Leg Med (Tokyo) 1:164-168 (2003a)

Bender K, Stradmann-Bellinghausen B, Rittner C, Schneider PM: Genotyping of 9 STR systems in combination with 11 diallelic polymorphisms on the Y-chromosome by fragment analysis and minisequencing. International Congress Series 1239: 283-286 (2003b)

Boles TC, Snow CC, Stover E: Forensic DNA testing on skeletal remains from mass graves: a pilot project in Guatemala. J Forensic Sci 40: 349-355 (1995)

Brandstätter A, Parson TJ, Parson W: Rapid screening of mtDNA coding region SNPs for the identification of west European Caucasian haplogroups. Int J Legal Med 117: 291-298

Braun a, Little DP, Koster H: Detecting CFTR gene mutations by using primer oligo base extention and mass spectrometry. Clin Chem 43: 1151-8 (1997)

Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC:Analysis of the variable number of tandem repeats locus D1S80 by the polymerase chainreaction followed by high resolution polyacrylamid gel electrophoresis. Am J Hum Genet 48: 137-144 (1991)

Butler JM, Li J, Shaler TA, Monforte JA, Becker CH: Reliable genotyping of short tandem repaet loci without an allelic ladder using time-of-flight mass spectrometry. Int J Legal Med 112: 45-49 (1999)

Cai H, White PS, Torney D, Deshpande A, Wang Z, Marrone B, Nolan JP: Flow cytometry-based minisequencing: a new platform for high throughput single-nucleotide polymorphism scoring. Genomics 66: 135-143 (2000)

Chakravarti A: ...to a future of genetic medicine. Nature 409: 822-824 (2001)

Collins A, Lonjou C, Morton NE: Genetic epidemiology of single-nucleotide polymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA 96: 15173-15177 (1999)

Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A: A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. Genome Res 8: 1229-1231 (1998)

Dupuy BM, Andreassen R, Flønes AG, Tomassen K, Egeland T, Brion M, Carracedo A, Olaisen B: Y-chromosome variation in a Norwegian population sample. Forensic Sci Int 117: 163-173 (2001)

Eaden J, Mayberry MK, Sherr A, Mayberry JF: Screening: the legal view. Public Health 115: 218-21 (2001)

European mtDNA Population Database, EMPOP (2003 persönliche Mitteilung)

Feng L, Nerenberg M: Electronic microarray for DNA analysis. Gene Ther Mol Biol 4: 183-191 (1999)

Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy C, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, Sullivan K: Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. Nat Genet 6: 130-135 (1994)

Gill P, Hussain J, Millington S, Long A, Tully G: An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes. Int J Legal Med 114: 204-210 (2001)

Hearne CM, Ghosh S, Todd JA: Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. Trends Genet 8: 288-294 (1992)

Hurles ME, Veitia R, Arroyo E, Armenteros M, Bertranpetit J, Pérez-Lezaun A, Bosch E, Shlumukova M, Cambon-Thomsen A, McElreavey K, López de Munain A, Röhl A, Wilson IJ, Singh L, Pandya A, Santos FR, Tyler-Smith C, Joblin MA: Recent male-mediated gene flow over a linguistic barrier in Iberia, suggested by analysis of a Y-chromosomal DNA polymorphism. Am J Hum Genet 65: 1437-1448 (1999)

Jobling MA, Tyler-Smith C: Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution. Trends Genet 11: 449-456 (1995)

Jobling MA: Y-chromosomal SNP haplotype diversity in forensic analysis. Forensic Sci Int 118: 158-162 (2001)

Kan YW, Dozy AM: Polymorphism of DNA sequence adjacent to human β-globin structural gene: relationship to sickle mutation. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 5631-5635 (1978)

Kayser M, Brauer S, Weiss G, Schiefenhövel W, Underhill PA, Stoneking M: Independent histories of human Y chromosomes from Melanesia and Australia. Am J Hum Genet 68: 173-190 (2001)

Krawczak M: Informativity assessment for biallelic single nucleotide polymorphisms. Electrophoresis 20: 1676-1681 (1999)

Kricka LJ: Miniaturization of analytical systems. Clin Chem 44: 2008-2014 (1998)

Kruglyak L, Nickerson DA: Variation is the spice of life. Nat Genet 27: 234 – 236 (2001)

Lareu M, Puente J, Sobrino B, Quintáns B, Brión M, Carracedo A: the use of the lightcycler for the detection of Y chromosome SNPs. Forensic Sci Int 118: 163-168 (2001)

Li J: Single nucleotide polymorphism determination using primer extention and time-of-flight mass spectrometry. Electrophoresis 20: 1258-1265 (1999)

Lindblad-Toh K, Winchester E, Daly MJ, Wang DG, Hirschhorn JN, Laviolette J-P, Ardlie K, Reich DE, Robinson E, Sklar P, Shah N, Thomas D, Fan J-B, Gingeras T, Warrington J, Patil N, Hudson TJ, Lander ES: Large-scale discovery and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the mouse. Nat Genet 24: 381-386 (2000)

Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ: Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 63: 4516-22 (1997)

Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S: A third hypervariable region in the human mitochondrial D-loop**.** Hum Genet 101: 384 (1997)

Macmillan C, Lach B, Shoubridge EA: Variable distribution of mutant mitochondrial DNAs (tRNA(Leu[3243])) in tissues of symptomatic relatives with MELAS: the role of mitotic segregation. Neurology 43: 1586-1590 (1993)

Makridakis NM, Reichardt JK: Multiplex automated primer extension analysis: simultaneous genotyping of several polymorphisms. Biotechniques 31: 1374-1380 (2001)

Marsh HP, Haldar NA, Bunce M, Marshall SE, Le Monier K, Winsey SL, Christodoulos K, Cranston D, Welsh KI, Harris AL: Polymorphisms in tumour necrosis factor (TNF) are associated with risk of bladder cancer and grade of tumour at presentation. Br J Cancer 89: 1096-1101 (2003)

Marth GT, Korf I, Yandell MD, Yeh RT, Gu Z, Zakeri H, Stitziel NO, Hillier L, Kwok P-Y, Gish WR: A general approach to single-nucleotide polymorphism discovery. Nat Genet 23: 452-456 (1999)

Mitchell RJ, Hammer MF: Human evolution and the Y chromosome. Curr Opin Genet Dev 6: 737-742 (1996)

Morley JM, Bark JE, Evans CE, Perry JG, Hewitt CA, Tully G : Validation of mitochondrial DNA minisequencing for forensic casework. Int J Legal Med 112: 241-248 (1999)

Nollau P, Wagener C: Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. Clin Chem 43: 1114-1128 (1997)

Norton N, Williams NM, Williams HJ, Spurlock G, Kirov G, Morris DW, Hoogendoorn B, Owen MJ, O'Donovan MC: Universal, robust, highly quantitative SNP allele frequency measurement in DNA pools. Hum Genet 110: 471-478 (2002)

Parson W, Parson TJ, Scheithauer R, Holland MM: Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial DNA d-loop sequences: application of mtDNA sequence analysis to a forensic case. Int J Legal Med 111: 124-132 (1998)

Pastinen T, Kurg A, Metspalu A, Peltonen L, Syvänen A-C: Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. Genome Res 7: 606-614 (1997)

Pastinen T, Partanen J, Syvänen A-C: Multiplex, fluorescent, solid-phase minisequencing for efficent screening of DNA sequence variation. Clin Chem 42: 1391-1397 (1996)

Pfeiffer H, Steighner R, Fisher R, Mörnstad H, Yoon C-L, Holland MM: Mitochondrial DNA extraction and typing from isolated dentin-experimental evaluation in a Korean population. Int J Legal Med 111: 309-313 (1998)

Robin ED, Wong R: Mitochondrial DNA molecules and virtual numbers of mitochondria per cell in mammalian cells. J Cell Physiol 136: 507-513 (1988)

Ross P, Hall L, Smirnov I, Haff L:High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. Nature Biotechnol 16: 1347-1351 (1998)

Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody MC, Linton L, Lander ES, Altshuler D, International SNP Map Working Group: A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature 409: 928-33 (2001)

Sanger F, Nicklen S, Coulson: DNA-sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-5467 (1977)

Schmalzing D, Kounty L, Chishoplm D, Adourian A, Matsudaira P, Ehrlich D: Two-color multiplexed analysis of eight short tandem repeat loci with an electrophoretic device. Anal Biochem 270: 148-152 (1999)

Shapero MH, Leuther KK, Nguyen A, Scott M, Jones KW: SNP genotyping by multiplexed solid-phase amplification and fluorescent minisequencing. Genome Res 11: 1926-1934 (2001)

Su B, Kiao J, Underhill P, Deka R, Zbang W, Akey J, Huang W, Shen D: Y-chromosome evidence for a northward migration of modern humans into Eastern Asia during the last Ice Age. Am. J. Hum.Genet. 65: 1718-1724 (1999)

Stoneking M: From the evolutionary past... Nature 409: 821-822 (2001)

Syvänen A-C:From gels to chips:“Minisequencing“ primer extention for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. Hum Mut 13: 1-10 (1999)

Szibor R, Michael M, Plate I, Krause D: Efficiency of forensic mtDNA analysis case examples demonstrating the identification of traces. Forensic Sci Int 113: 71-78 (2000)

Tautz D, Schlotterer C: Simple sequences. Curr Opin Genet Dev 4: 832-837 (1994)

Thomson R, Pritchard JK, Shen P, Oefner PJ, Feldmann MW: Recent common ancestry of human Y chromosomes: evidence from DNA sequence data. Proc Natl Acad Sci USA 97: 7360-7365 (2000)

Tully G, Sullivan KM, Nixon P, Stones RE, Gill P: Rapid detection of mitochondrial sequence polymorphisms using multiplex solid-phase fluorescent minisequencing. Genomics 15: 107-113 (1996)

Turner D, Choudhury F, Reynard M, Railton D, Navarrete C: Typing of multiple single nucleotide polymorphisms in cytokine and receptor genes using SNaPshot. Hum Immunol 63: 508-513 (2002)

Wang DG, Fan J-B, Siao C-J, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson

TJ, Lipshutz R, Chee M, Lander ES: Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. Science 280: 1077-1082 (1998)

Weber JL: Informativeness of human (dC-dA)n.(dG-dT)n polymorphisms. Genomics 7: 524-530 (1990)

Wilson MR, Stonekin M, Holland MM, DiZinno JA, Budowle B: Guidelines for the use of mitochondrial DNA sequencing in forensic science. Crime Laboratory Digest 20: 68-77 (1993)

Zerjal T, Dashnyam B, Pandya A, Kayser M, Roewer L, Santos FR, Schiefenhövel W, Fretwell N, Joblin MA, Harihara S, Shimizu K, Semjidmaa D, Sajantila A, Salo P, Crawford MH, Ginter EK, Evgrafov OV, Tyler-Smith C: Genetic relationship of Asians and northern Europeans, revealed by Y-chromosomal DNA analysis. Am J Hum Genet 60: 1174-1183 (1997)

8. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei PD Dr. rer nat P. Wiegand für die Bereitstellung des Themas aus seiner Arbeitsgruppe, sowie für die zahlreichen Vorschläge und die freundliche Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. E. Miltner danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seiner Abteilung abschließen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Rachel Klein und Simone Reis für ihre große Hilfsbereitschaft und Geduld bei jeglicher Art von Fragen und Problemen, sowie für die überaus angenehme Atmosphäre im Labor.

Des weiteren möchte ich Nicole Wasch für ihre Hilfestellungen bei der Einarbeitung dieser Arbeit danken.

Für die Tipps und Tricks im Umgang mit Primern möchte ich Enrico Schmid danken.

Auch meinem Mann Andreas möchte ich vielmals danken für all die aufmunternden Worte, wenn einige Versuchsreihen nicht immer so funktionierten, wie ich es mir erhofft hatte.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, die mir die Möglichkeit zum Studium der Medizin überhaupt erst gegeben haben und denen ich daher diese Arbeit gewidmet habe.

9. Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.